Beiträge zur Biologie des Bacillus Anthracis – mit besonderer Berücksichtigung der Sporenbildung – u. ihre Bedeutung für die bakteriologische Milzbranddiagnose.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der

MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der

GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT ZU GÖTTINGEN

vorgelegt von

OTTO MANEGOLD

aus Riddagshausen.

1924

Buchdruckerei Joseph Giesel, Hannover.

Beiträge zur Biologie des Bacillus Anthracis – mit besonderer Berücksichtigung der Sporenbildung – u. ihre Bedeutung für die bakteriologische Milzbranddiagnose.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der

MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der

GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT ZU GÖTTINGEN

vorgelegt von

OTTO MANEGOLD

aus Riddagshausen.

Buchdruckerei Joseph Giesel, Hannover.

Die Drucklegung der nachstehenden Dissertation wird genehmigt.

Göttingen, den 12. November 1924.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Referent: Geheimer Medizinalrat Professor Dr. Reichenbach.

Die Erforschung der Entwickelungsgeschichte des Bacillus anthracis in ihren Grundzügen und damit auch die Klarlegung der Entstehungsweise des Milzbrandes und seiner Beziehungen zu den örtlichen Verhältnissen verdanken wir **Robert Koch.**

Durch seine klassischen Arbeiten aus den Jahren 1876 bis 1881 (84, 85) bewies der geniale Forscher einwandfrei, daß die im Blut milzbrandkranker Tiere gefundenen Stäbchen (Bazillen) in geeigneten Nährflüssigkeiten innerhalb gewisser Temperaturgrenzen und bei Luftzutritt zu langen, unverzweigten Fäden auswachsen, in denen sich zahlreiche Sporen bilden. Ferner entdeckte **Koch** die für die Aetiologie des Milzbrandes und für die epidemiologischen Erfahrungen hochwichtige Tatsache, daß die Sporen im Gegensatz zu den Stäbchen sich jahrelang lebensfähig und virulent erhalten können, um schließlich, sobald sie günstige Bedingungen (Feuchtigkeit, Wärme) antreffen, wie sie z. B. im Tierkörper oder in künstlichen Nährböden gegeben sind, wieder zu Bazillen auszukeimen.

Zahlreiche Forscher haben später die epochemachenden Entdeckungen **R. Kochs** vollauf bestätigt und vielfach ergänzt. Da einige der späteren Ergebnisse der Milzbrandforschungen für die Diagnose und Aetiologie des Milzbrandes von Bedeutung sind, so mögen sie hier kurz Erwähnung finden.

Wie seine nächsten Verwandten aus der Gruppe der Heu-, Wurzel- und Erdbazillen — nach **Matzuschita** (106) etwa 100 Arten — zeichnet sich der Milzbrandbazillus durch folgende biologischen Merkmale aus: Färbbarkeit nach **Gram**, Faden- und Sporenbildung, Verflüssigung der Gelatine, Caseinfällung und spätere Auflösung des Coagulums, Säurebildung aus Traubenzucker ohne Gas, geringe Schwefelwasserstoffbildung.

Von der Mehrzahl seiner Verwandten unterscheidet sich der B. anthracis dadurch, daß er unbeweglich ist, in Bouillon einen schleimig-flockigen Bodensatz und keine Kahmhaut bildet. Die über den Flocken stehende Bouillon bleibt in der Regel vollständig klar.

Ob der B. anthracis toxische Substanzen bezw. ein Hämolysin bildet ist fraglich. Die sich widersprechenden Angaben der

Autoren über beobachtete Hämolyse (nach **Baerthlein** 5 besser Hämopepsie) erklären sich vielleicht durch die Feststellung **Uémaras** (173), wonach vollvirulente Bazillen keine Hämolyse, Milzbrandbazillen von geringer Infektiosität dahingegen Hämolyse hervorrufen sollen. Blut von verschiedenen Tieren dürfte hierbei ebenfalls eine Rolle spielen.

Gelangen die Milzbrandbazillen außerhalb des Tierkörpers auf einen günstigen Nährboden, der sich ihnen in der Natur vielfach bietet, z. B. alkalischer Rinderkot, mit Blut, Harn usw. durchfeuchteter Erdboden, so vermögen sie sich, wie ich weiter unten näher ausführen werde, bei genügend hoher Temperatur und vor Sonnenlicht geschützt (**Arloing** 3, **Ward** 177) reichlich zu vermehren. Tritt dagegen nach vorausgegangener guter Ernährung eine gewisse Erschöpfung des Nährbodens bezw. eine Verdünnung mit Wasser (**Buchner** 16) ein, so bilden sich bei Sauerstoffzutritt und bei einer Temperatur von 13 bis 42 Grad C. innerhalb der Bazillen eigentümliche, starklichtbrechende, eirunde Sporen. Diese Dauerformen des B. anthracis sind weder durch die größte Kälte (7tägige Einwirkung einer Temperatur von — 182 bis — 192 Grad, nach anderen sogar — 190 bis — 220 Grad Cels.), wie die Versuche von **White** (182), **Ravenel** (136), **J. Meyer** (108) u. a. mit flüssiger Luft gezeigt haben, noch durch eine zehn Minuten lange Einwirkung von +110 Grad Cels. abzutöten.

Im Gegensatz zu den Sporen sind die vegetativen Formen des B. anthracis weit weniger widerstandsfähig. Im frischen Milzbrandblut sollen die Stäbchen nach **Bongert** (14) bei 75 Grad Cels. in einer Minute, bei 55 Grad in 40 Minuten, durch Fäulnis in wenigen Tagen, im geschlossenen Kadaver oft schon nach 24 bis 48 Stunden abgetötet werden. Im eingetrockneten Blute zeigen sich die Milzbrandbazillen resistenter und sollen sich nach **Momont** (113) bis zu 57 Tagen lebensfähig erhalten. In eingetrocknetem Milzbrandblute will **Bongert** (l. c.) noch nach 40 Tagen lebensfähige und virulente Milzbrandbazillen nachgewiesen haben.

Außerordentlich wichtig für die **Differentialdiagnose des Milzbrandes** ist ferner die Eigenschaft seines Erregers, **Varietäten** zu bilden. Solche abweichende Formen des B. anthracis wurden von **Lignières** und **Durien** (98), **Buchner** (l. c.), **Klein** (Quart. Journ. of microsc. sc. 1894 April), **Chauveau** (20) u. a. beobachtet.

Wie **Eisenberg** (29) bewiesen hat, erfolgt die Umwandlung in eine rein asporogene Rasse nicht gleichmäßig an allen Angehörigen einer Kultur, sondern schritt- und sprungweise. Mit der Zahl der Überimpfungen beobachtet man eine erhebliche Abnahme der Virulenz der asporogenen Varietät, die jedenfalls mit der verminderten Widerstandskraft gegenüber der Phagocytose zusammenhängt.

Nach der Art der Kulturen und ihren Wachstumsverhältnissen unterscheidet man:

typische feingestrichelte Oberflächenkolonien (Varietas striata) und atypische scharfberandete schleimige Kolonien (Varietas mucosa).

Nach **Baerthlein** (l. c.) gibt es atypische Formen: große helle durchscheinende zerfließliche Kolonien, bestehend aus schlankeren gut färbbaren, meist in Ketten angeordneten Stäbchen, die in der Regel asporogen sind und kleinere saftige trübe gelblich-weiße Formen, die aus kurzen dicken plumpen schlecht färbbaren, reichlich sporulierenden Stäbchen bestehen. Zwischen diesen beiden Mutanten besteht kein Unterschied in der Virulenz. Einzelne Varietäten besitzen auch bei Tierpassage eine beträchtliche Konstanz.

Als Ursache dieser Mutationserscheinungen werden angegeben: Alter der Kultur, Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnisse sowie individuelle Veranlagung. So erhält man z. B. bei 42,5 Grad C. oder durch Abschwächung (Fäulnis, spontane, nicht näher bekannte Ursachen) vom typischen Bau abweichende Kolonien. Nach **Henri** (64) vermögen auch die ultravioletten Strahlen Mutationsformen zu erzeugen.

Markoff (102), der 53 Kulturen verschiedener Milzbrandstämme prüfte, fand darunter 5 Varietäten und atypische Formen (verschiedenes makro- und mikroskopisches Aussehen der Oberflächenagarkulturen, schwache Trübung der Bouillonkulturen, Borstenbildung oder Ausbleiben derselben im Gelatinestich, Fehlen der Fadenbildung auf gewöhnlichem Agar).

Daß Milzbrandbazillenvarianten unter natürlichen Verhältnissen ebenfalls vorkommen, beweisen die Beobachtungen von **M. Müller** (115) und **Wagner** (175), die unmittelbar aus einer milzbrandkranken Kuh (Fall Müller) und aus einer menschlichen Leiche (Fall Wagner) abweichende Milzbrandbazillen züchteten.

Der letztere Stamm (gekrümmte S-förmige Gestalt der Stäbchen, regellose Anordnung der Scheinfäden in der Kolonie) verhielt sich im übrigen wie Milzbrand und war voll virulent.

Eine gewisse **Bedeutung für die Milzbranddiagnose** hat die Fähigkeit des B. anthracis, eine Kapsel zu bilden, worauf zuerst **Serafini** (159) hingewiesen hat. Die Frage, ob diese nach **Heim** (62) aus Muzin, nach **v. Behring** und **Much** aus Oxyphilin bestehende Kapsel nur im Körper entsteht und als Ausdruck einer besonderen Widerstandsfähigkeit zu gelten hat, ist viel umstritten.

Gruber und **Futaki** (58), **Preiß** (135), **Süpfle** (168) u. a. sehen die Kapsel als eine besondere Schutzvorrichtung der tierischen (animalisierten) Bazillen gegenüber den milzbrandfeindlichen Körpersäften an, während **Sclavo** (157), **Fischoeder** (38) u. a. der Ansicht sind, daß die Kapsel nur einen unter besonderen Verhältnissen zu beobachtenden Quellungszustand darstellt, der die Kapsel für den Farbstoff erst zugängig macht. Beide Anschauungen haben etwas für sich und können nach meinem Dafürhalten auch richtig sein. Wie nämlich **Turrò** (172) durch seine interessanten Versuche nachgewiesen hat, werden Mycelien durch in den Körpersäften enthaltene diastaseartige Stoffe angegriffen, welche deren Protoplasma zum Aufquellen bringen, sodaß Kapseln entstehen. Er faßt den Vorgang der Kapselbildung und Bakterienschmelzung als einen Verdauungsprozess auf, der durch die bei der Verflüssigung der festen Blutbestandteile freigewordenen Diastasen (Lysine Duclauxs) eingeleitet wird. Diese Lysine wirken am besten bei alkalischer Reaktion der Flüssigkeit und bei Körpertemperatur. Es ist sehr wohl möglich, daß diese nach **Woloschin** (185) als eine Modifikation der peripheren Schicht des Ektoplasmas aufzufassende Hülle den in den Tierkörper eingedrungenen Milzbrandbazillen einen gewissen Schutz gegenüber den Abwehrkräften verleihen kann. Damit dürfte auch übereinstimmen, was von verschiedenen Autoren (**Süpfle** l. c., **Bail** (6) u. a. beobachtet worden ist, und vom Verfasser bestätigt werden kann, daß gerade die widerstandfähigsten Milzbrandbazillen eine Kapsel zu haben pflegen, während die abgeschwächten meist kapsellos sind. So bildet nach **Preisz** (l. c.) der avirulente Bazillus weder im Tierkörper, noch in Blutseris oder auf Nährböden Kapseln. Auch **Stiennon** (166) konnte feststellen, daß nach Injektion von Milzbrandbazillen mit Kapseln die Phagocytose ausbleibt.

Wüstenberg (187), der die Kapsel des Milzbrandbazillus für ein Kunstprodukt hält, ist vielleicht durch die Arbeit **Bonis:** Methode zur Darstellung einer «Kapsel» bei allen Bakterienarten (Zentralbl. f. Bakt. 1900, S. 705) zu dieser Ansicht gelangt. Diese Behauptung läßt sich m. E. schon dadurch widerlegen, daß die mikrochemische Muzinreaktion, welche die — übrigens auch bei anderen Bakterienarten zu beobachtende — Hülle gibt, sowie die deutlich sichtbare Kapsel im Tuschepräparat unmöglich ein Kunstprodukt sein kann. Auch die eigenartige konstante Erscheinung dieser Kapsel nur bei wohl charakterisierten Bakterienarten bezw. Abarten (z. B. bei dem vom Verfasser beschriebenen Streptococcus capsulatus gallinarum) und das Nichtauftreten derselben bei den Pseudomilzbrandbazillen, nicht einmal in Serumkulturen (**Uémara** l. c.) dürften gegen die Auffassung **Wüstenbergs** sprechen. Ebenfalls lassen sich die Ergebnisse der Untersuchungen **Bails** (l. c.) schwerlich mit der Anschauung **Wüstenbergs** in Einklang bringen. **Bail** stellte nämlich fest, daß der Verlust von Infektiosität und Kapselbildung bei der Serumkultur in strenger Korrelation stehen, während eine solche zwischen Kapselbildung und Sporulation nicht besteht. Der **einmal seiner Kapselbildung und Infektiosität beraubte Milzbrandbazillus ist konstant und der Verlust wird konstant weiter vererbt.** Im Gegensatz zu **Ottolenghi** und **Ciani** ist es ihm auf keine Weise gelungen, die Fähigkeit zur Kapselbildung zu regenerieren. Impfung mit der kapsellosen Varietät erzeugte im allgemeinen keine Immunität gegen Impfung mit kapselbildendem Milzbrand.

Interessant ist ferner die Beobachtung **Ottolenghis** (123) und **Cianis** (21), daß Milzbrandbazillen in einem durch längeres Wachstum seiner kapselbildenden Fähigkeit beraubten Blutserum nach Zusatz von Traubenzucker wieder Kapseln bilden. Daß das Serum allein zur Auslösung der Kapselbildung nicht notwendig ist, hat **Rotky** (144) gezeigt, dem die Züchtung typischer Kapselbazillen in vollkommen eiweißfreier Flüssigkeit gelungen ist. **Kodoma** (87) und **Steinschneider** (164) konnten auch Milzbrandbazillen mit Kapseln erhalten bei Züchtung auf Hühnereiweiß bezw. auf festen Nährböden mit Zusatz von Hühnereiweiß. Nach **Kodama** soll die Alkaleszenz (die einer 200fachen Normalsodalösung) die Ursache der Kapselbildung sein, eine Beobachtung, die mit der **Turrò** übereinstimmt (s. oben). Diese Feststellungen lassen vermuten, daß jedenfalls der Alkal-

eszenzgrad des Blutes bei der Kapselbildung eine wichtige Rolle spielt. Vielleicht erklärt sich so auch das häufige Fehlen der Kapsel beim Milzbrand der Schweine, Fleischfresser usw. (s. p. 7). Nach **Munk** (Physiologie) ist der Gehalt des Blutserums an Natriumkarbonat (im Mittel 0,25%) bei Herbivoren durchschnittlich größer als bei Carnivoren und Omnivoren.

Zur **Darstellung der Milzbrandbazillenkapsel** bediente sich **Serafini** der Ehrlich'schen Gentianaviolettlösung und entfärbte kurze Zeit in Alkohol. **Pianese** (129) färbte dieselbe mit Karbolfuchsin und entfärbte ebenfalls mit Alkohol. Die sonstigen von **Johne, Lüpke, Klett, Noetzel, Raebiger** u. a. angegebenen Kapseldarstellungsmethoden beruhen teils auf der Eigenschaft der Kapsel (Gallert-, Muzinhülle), den Farbstoff weniger leicht aufzunehmen als der Bazillenleib (z. B. in sehr dünner Farblösung, 0,2% Gentianaviolettlösung — Lüpke — oder bei sehr kurzer Färbung mit Formalin-Gentianaviolett bzw. — -Fuchsin — Raebiger, Preuße) oder denselben infolge Einwirkung geeigneter Entfärbungsmittel (Alkohol, erwärmtes Wasser — Klett, 2%ige Essigsäure — Johne, Fuchsinlösung — Klett) schneller wieder abzugeben, als der Bazillenleib. Endlich dürfte die metachromatische Färbung auch auf einer mikrochemischen Reaktion beruhen (z. B. bei der Färbung nach **Olt, Giemsa** usw.). Nach **Heim** (62) läßt sich die Kapsel mit allen die Muzinreaktion gebenden Farben darstellen, so mit rotstichigem Methylenblau, Methylazur, Thionin, Lauthschem Violett, Formalin-Gentianaviolett, Safranin, Muzikarmin.

Will man gleichmäßig gute Präparate erhalten, so empfiehlt es sich, die Ausstriche nicht durch die Flamme zu ziehen, sondern um ein Schrumpfen der Kapsel zu verhüten, mit Formalin oder Alkohol zu fixieren. Ferner muß man die Vorsicht beobachten, daß die Wasserspülung möglichst kurz geschehe und daß sofort gut getrocknet wird, weil sonst das Wasser die Farbe wieder **auszieht.**

Bei meinen vergleichenden Studien über die verschiedenen Kapselfärbungen erhielt ich die besten Resultate nach **Klett** II, nach **Giemsa** und mit der Carbol-Methylgrün-Pyronin-Färbung nach **Pappenheim-Unna.** Letztere bietet den Vorteil, daß man nie überfärben kann. Ich färbte durchschnittlich 5—8 Minuten. Fixiert man den Ausstrich mit Formalin, so beobachtet man sehr

schöne breite, schwach bläulich gefärbte Kapseln, während der Bazillenleib rot bis rotviolett sich zeigt. Fixiert man mit Alkohol, so erscheinen die Bazillenleiber leuchtend rot und die Kapseln hellgrünlichgelb bis bläulich je nach Dauer der Färbung. Eine vorzügliche Methode zur Negativdarstellung der Kapsel ist auch das Tuschepräparat nach **Burri.**

Die **differentialdiagnostische Bedeutung** der Milzbrandbazillenkapsel, die ehemals für das sicherste Erkennungsmittel des B. anthracis gehalten wurde (vergl. **Johne** in **Baumgartens** Jahresbericht XII S. 703), hat neuerdings sehr eingeschränkt werden müssen, seitdem zahlreiche Fälle bekannt geworden sind, in denen es nicht gelang, die Hülle bei zweifellosen Milzbrandbazillen durch die verschiedensten Färbemethoden nachzuweisen. Dies ist nach den Beobachtungen von **Smith** (The Veterinarian LXX 61, 131), **v. Ostertag** (nach **Fischroeder** 39) u. a., sowie nach den Erfahrungen des Verfassers sehr häufig beim Milzbrand der Pferde und beim lokalen Milzbrand der Schweine der Fall. Daß selbst bei der Milzbrandsepticaemie des Schweines solche zweifelhaften Befunde nicht selten sind, zeigen folgende Fälle: Dem Hygienischen Institut zu Hannover wurden verschiedentlich Organe von Schweinen zur Untersuchung auf Rotlauf eingesandt. In einem Falle stammten Milz und Nieren von einem einige Tage vorher gegen Rotlauf geimpften Tiere. In den nach **Gram** gefärbten Ausstrichpräparaten konnte jedoch der Bazillus rhusiopathiae suis nicht nachgewiesen werden, wohl aber fanden sich vereinzelte dicke, kurze Stäbchen, die man nicht ohne weiteres für Milzbrandbazillen halten konnte, weil sie weder nach der Klettschen Doppelfärbung, noch mit Safranin oder Formalin-Gentianaviolett gefärbt, eine Kapsel zeigten. Der angestellte Impfversuch sowohl, als auch das Plattenkulturverfahren ergaben jedoch unzweifelhaft die Diagnose «Milzbrand».

Nicht allein unter dem Einfluß der Fäulnistoxine, sondern auch durch die Einwirkung anderer Schädlichkeiten (Bakterio-Lysine) verwischen sich die als charakteristisch angesehenen Formmerkmale, sodaß man die Milzbrandbazillen von ähnlichen Stäbchen mit absoluter Sicherheit nicht mehr unterscheiden kann.

Hiermit stimmt auch die Beobachtung **Heims** (l. c. p. 346) überein, wonach man die Bazillen im Milzbrandkarbunkel häufig geschädigt findet. Sie erscheinen schmäler, als man sie sonst zu sehen gewohnt ist und färben sich schlechter, einzelne Ab-

schnitte garnicht. Die roten Kapseln sind meist nur angedeutet, können sogar fehlen.

Andererseits mahnen die wiederholten Funde von Kapselbazillen — namentlich in faulem Material — welche dem Milzbrand-Bazillus zuweilen sehr ähnlich sehen, zur Vorsicht.

So lassen sich nach den Untersuchungen von **Noetzel** (119) bei verschiedenen im Kadaver 10—15 Stunden nach dem Tode vorkommenden Bakterienarten mit der Johneschen Färbemethode Kapseln nachweisen.

Auch **Berndt** fand in faulenden Milzen nicht selten Bakterien, die eine nach **Klett** und mit Safranin deutlich färbbare Hülle zeigten. Diese Bakterien bestanden regelmäßig nur aus zwei (nach **Klett**) dunkelblau gefärbten Segmenten. Bakterien von gleicher Form konnten vom Verfasser auch im Pferdeblut, das dem oben genannten Institut zur Untersuchung eingesandt war, nachgewiesen werden. Ähnliche, jedoch schmälere Diplobazillen, die bei der Färbung nach **Klett** eine deutliche Kapsel erkennen ließen, fanden sich in großer Zahl in einer zur Untersuchung auf Milzbrand zugesandten Rindermilz.

Ferner fand **Collin** (22) im Fischmehl ein unbewegliches, sporenfreies Bakterium, den **Diplobacillus capsulatus,** der für kleine Versuchstiere sowohl bei subcutaner, cutaner als auch bei stomachikaler Applikation hochpathogen ist.

Endlich wären noch einige Kapselbazillen, die meist beim Menschen gefunden wurden, zu erwähnen, von denen ebenfalls mehrere für Mäuse und Meerschweinchen pathogen sind:

1. **Bacillus proteus capsulatus Bordoni-Uffreduzzi** (15), gram-positiv, dicker als B. anthracis, zeigt unregelmäßige Größe und verschiedenartige Krümmungen, Gelatinestich nagelförmig, keine Verflüssigung;
2. **Bacterium ozaenae** (1) plumpe Stäbchen, von wechselnder Länge, mit breiter Kapsel; gramnegativ. Dasselbe tötet Mäuse in 1—4 Tagen. An der Impfstelle entsteht ein starkes Infiltrat. Milz vergrößert;
3. **Bact. sputigenum crassum,** nach **Kreibohm (Flügge,** l. c. p. 431) im Sputum, Zungenbelag, usw. vorkommend; kurze, oft wurstförmig gebogene und verquollene Stäbchen, die sich nach **Gram** färben;
4. **Bacillus pneumoniae Friedländer** (Fortschritte der Med. I., 22)

5. **Bact. lactis aerogenes,** nach **Escherisch** und **Kruse** (91) häufig im Darm, in der Luft, im Wasser usw. zu finden;
6. **Bacillus lactis viscosus** (2), außerordentlich kurze, leicht mit Kokken zu verwechselnde Stäbchen, die in Milchkulturen von einer sehr dicken Hülle umgeben sind. Eigenbewegung im geringen Maße vorhanden.

Die unter 2, 4 und 5 genannten Bakterien sind gramnegativ und dadurch schon leicht vom B. anthracis zu unterscheiden.

Strong (167) führt in seiner Arbeit außerdem noch an: den Bacillus capsulatus septicus, B. capsulatus mucosus Wright, B. rhinoscleromatis, B. Mallory und den B. Pfeiffer. Nach ihm soll eine Gruppe auch in künstlichen Nährböden eine leicht färbbare Kapsel besitzen, die andere Gruppe nur in flüssigem Blutserum oder Milch.

Ferner können im Blute und in den gewöhnlich untersuchten inneren Organen die Milzbrandbazillen so spärlich vorhanden sein, daß es durch mikroskopische Untersuchung eines gefärbten Ausstrichpräparates nicht möglich ist, dieselben nachzuweisen (**Bongert** 13 u. a.)

Fiorentini (37) berichtete über einen Fall von intestinalem Milzbrand, bei dem im Blut, in der Milz und der Leber nur ganz vereinzelte, dahingegen in den Mesenteriallymphknoten zahlreiche Milzbrandbazillen nachzuweisen waren. Er empfiehlt daher, in Fällen von Darmmilzbrand stets die Gekrösdrüsen zu untersuchen. Auch andere Autoren (**Foth** 43, **Galtier** 49) sowie der Verfasser haben später wiederholt dieselbe Beobachtung machen können. **Galtier** betont, daß besonders beim Milzbrand mit protahiertem Verlauf Bazillen im Blute nur sehr spärlich vorhanden sein oder gänzlich fehlen können und auch die Milz ein völlig normales Aussehen haben kann.

Auf diese, sehr ungleichmäßige Verbreitung des Milzbranderregers im Tierkörper weist übrigens schon **Virchow** (Handbuch der spec. Pathologie und Therapie, 1855, Bd. 1 S. 395) hin und bemerkt dazu, daß sich so wohl zum Teil die widersprechenden Angaben der Autoren über die infektiöse Eigenschaft milzbrandiger Kadaverteile erklären lassen.

In solchen Fällen leistet unzweifelhaft der **Tierversuch** oft vorzügliche Dienste, wenn er auch nicht allemal einen endgiltigen Aufschluss zu geben vermag; insbesondere dann nicht, wenn

die Milzbrandkeime unter einem gewissen zahlenmäßigen Verhältnis zu anderen Keimen (Antagonisten) in dem zu untersuchenden Material enthalten sind (**Gottstein** 56).

Da nach Verimpfung von faulem Material, in dem die Milzbrandkeime abgeschwächt werden, die Versuchstiere häufig an malignem Oedem oder einer septischen Infektion durch Bakterien der Coligruppe usw. zugrunde gehen können, so sucht man die Konkurrenz anderer Bakterien dadurch möglichst auszuschalten, daß man das Blut oder die Organausstriche eintrocknen lässt. Dennoch werden aber trotz aller Vorsichtsmaßnahmen durch die Impfung negative Resultate erzielt, wenn man nämlich die Stellung der Diagnose von dem bakteriologischen Obduktionsbefund der geimpften Tiere abhängig machen will. Das Gelingen oder Mißlingen der Impfung hängt eben von mancherlei Zufälligkeiten ab (wie z. B. von der Empfänglichkeit der Impftiere).

Auch die von **Fischoeder** (39) angegebene Methode, garnicht erst den Tod der geimpften Mäuse abzuwarten, sondern die Impfhöhle auf frisch gewachsene, mit einer Kapsel umgebene Milzbrandbazillen zu untersuchen, dürfte wohl nach dem oben (S. 7 u. 8) Gesagten zu Fehldiagnosen Anlass geben.

Endlich soll es nach **Günther** (59) vorkommen, daß der in seiner Virulenz abgeschwächte Milzbrandbazillus, wenn er das Versuchstier noch zu töten vermag, in den Organen häufig zu langen, schleifenartig verschlungenen Fäden auswächst, die man im mikroskopischen Präparat nicht von den Fäden zu unterscheiden vermag, welche der Bazillus des malignem Oedems in den inneren Organen nach dem Tode bildet.

In einem derartigen Zweifelsfall kann eben, um die Diagnose zu sichern, außer der **Ascoli-Reaktion** nur noch die Kultur (am besten das Plattenverfahren) Aufschluss geben.

So vermochte **Heim** (61) durch Verimpfung von Gewebsteilen aus einer lokalen Milzbranderkrankung Mäuse nicht zu infizieren, wohl aber das Vorhandensein von Milzbrand durch die Kultur festzustellen.

Auch **Fränkel** (47) konnte dreimal durch das Plattenverfahren den Milzbrand nachweisen, während der Tierversuch mißglückte.

Desgleichen haben **Bongert** (13), **Fischoeder** (39) u. a. durch zahlreiche Versuche dargetan, daß durch das Plattenkulturverfahren in allen angeführten Fällen ein sicherer Nachweis des Vorhandenseins von Milzbrand erbracht werden konnte, während

sowohl die mikroskopische Untersuchung als auch die Impfung wiederholt im Stich ließ.

Endlich sei erwähnt, daß es dem Verfasser mit Hilfe des Plattenverfahrens noch gelungen ist, bei einem exhumierten Rinderkadaver, welcher bereits 5 Wochen unter der Erde gelegen hatte, Milzbrand mit Sicherheit festzustellen, während, wie nicht anders zu erwarten war, sowohl die mikroskopische Untersuchung, als auch die Impfung ein negatives Resultat lieferten. Das verdächtige Material (Lungenstück), in welchem Milzbrandbazillen wegen der starken Fäulnis nicht mehr vorhanden, wohl aber Sporen gebildet sein konnten, wurde in einem sterilen Mörser mit Bouillon verrieben, in ein steriles Gläschen gefüllt und 20 Minuten bei 65 Grad C. erhitzt, um die vegetativen Formen der Saprophyten abzutöten. Darauf wurden von dem feinverteilten Material 10 Agarplatten gegossen. Nach Verlauf von 2 mal 24 Stunden hatte sich auf einer einzigen Platte eine typische Milzbrandkolonie entwickelt, die sich bei weiterer Verimpfung als echter Milzbrand erwies.

Wie die angeführten Fälle beweisen, ist das Plattenverfahren ohne Zweifel zuweilen als ein feineres und schärferes Reagens als die Impfung zu bezeichnen (**Fränkel** l. c.).

Aber sich darauf allein verlassen und die Diagnose auf Grund des typischen Wachstums einer Kolonie stellen zu wollen, wäre ebenso verfehlt, wie die zahlreichen Funde sogenannter **Pseudomilzbrandbazillen** zeigen, die dem mit der Nachprüfung der Diagnose beauftragten Bakteriologen oft viel zu schaffen machen. Diese in ihren morphologischen Eigenschaften und im Wachstum den Milzbrandbazillen sehr ähnlichen Bakterienarten haben deshalb eine gewisse Bedeutung, weil sie auch bei erkrankten Menschen und Haustieren nachgewiesen worden sind. Bis jetzt sind etwa 30 verschiedene Pseudomilzbrandarten und -Stämme näher beschrieben, die aus tierischen Rohstoffen, pflanzlichen Futtermitteln, milzbrandverdächtigem Material etc. stammen:

Burri (18) Fleischfuttermehl; **Willach** (184) Blut einer unter milzbrandverdächtigen Erscheinungen verendeten Kuh; **Mc. Farland** (35) Abscesseiter; **Schulz** (155) Milch einer kranken Ziege; **Bainbridge** (8) Pferdehaare; **Bongert** (13) milzbrandverdächtiges Material; **Baas** (4) Mageninhalt vom Schwein etc.; **Ottolenghi** (123) Tierblut; **Levy** (97) Menschenhaare, Haarkrusten von Trichophytie; **Hoppe** (67) 3 Stämme aus Rinderkot

etc.; **Fitch** (40) Milzbrandverdacht vom Pferd; **Wilamowsky** (183) Pleuraexsudat vom Menschen; **Pfeiler** und **Drescher** (126) Milz von Rindern und Schweinen; **Poppe** (133) Milzbrandverdacht beim Schwein; **Neufeld** (117) Milzbrandverdacht beim Menschen; **Senge** (160) Lumbalflüssigkeit vom Menschen (Milzbrandverdacht); **Zingle** (189) Fischmehl; **Pokschischewsky** (131) 23 verschiedene milzbrandähnliche Stämme; **Schürmann** (156) Meningitis beim Menschen.

Da die meisten dieser Bazillen beweglich sind, unterscheiden sie sich schon dadurch mit absoluter Sicherheit vom Milzbrandbazillus. Sie trüben die Bouillon gleichmäßig oder bilden eine Kahmhaut. Abweichende Befunde hinsichtlich Beweglichkeit sind jedenfalls auf verschiedenes Alter der Kultur, auf verschieden zusammengesetzte Nährböden zurückzuführen. In jungen Kulturen sind sie meist beweglich, nach Eintritt der Sporenbildung manchmal unbeweglich (**Pokschischewsky** 130). Nach **Uémara** (l. c.) haben sie keine Kapsel, auch nicht in Serumkulturen. Sporenbildung erfolgt reichlicher und energischer als beim B. ánthracis, in Agarkulturen ist sie nach 24 Stunden bereits abgeschlossen. Die Sporen der Pseudomilzbrandbazillen sind nach **Lange** (94) besonders resistent. Sie sollen 12 bis 18 Stunden lang der Siedehitze widerstehen. Nach **Senge** (l. c.) sind sie durch Einwirkung von trockener Hitze (145 Grad C.) in 20 Minuten abzutöten. Nach dem Vorschlage **Langes** kann man daher auch die Resistenzprüfung der Sporen als Unterscheidungsmerkmal zwischen echten Milzbrand- und milzbrandähnlichen Bazillen heranziehen, wenn andere Merkmale versagen. Die Oberflächenkolonien der Pseudomilzbrandbazillen zeigen einen weniger haarlockenähnlichen Aufbau, am Rande eine geringere Zahl und vor allem unregelmäßiger gestaltete Ausläufer. Auf Kartoffel bildet die eine Gruppe einen rötlich-braunen Farbstoff (Typus: Pseudoanthracis), während die andere Gruppe eine Farbstoffbildung vermissen läßt (schmutziggrauer Belag: Typus Anthracoides). Im Gelatinestich zeigen sich ebenfalls zwei einheitliche typische Wachstumsformen. Die eine Gruppe zeigt quer zum Impfstich üppiges Breitenwachstum in Form dicker, sich verzweigender Ästchen, die andere Gruppe mit hauptsächlich den Stichkanal entlang vor sich gehendem Wachstum und zu beiden Seiten des Impfstichs knopfähnlichen Kolonien (Typus Anthracoides). Rasche Verflüssigung der Gelatine: bei der

ersten Gruppe parallel zur Oberfläche fortschreitend, bei der zweiten Gruppe trichterförmig. Auf der Blutagarplatte zeigten 18 geprüfte Pseudomilzbrandstämme starke hämolytische Eigenschaften (**Pokschischewsky** l. c., **Uémara** l. c., **Jarmai** 75, **Sirk** 162, **Köhler** 89), während echte Milzbrandbazillen weit weniger hämolytisch wirkten. Als differentialdiagnostisches Mittel kommt nach **Sirk** l. c. besonders die 10%ige Blutagarplatte (Ziegen- oder Pferdeblut) in Betracht. Der B. anthracis ruft bei seinem Wachstum auf diesen Platten keine Veränderung hervor, während der Pseudomilzbrandbazillus spätestens nach 24 Stunden einen deutlichen durchsichtigen hämolytischen Hof um die Kolonie erzeugt. Die Hämolysine des B. anthracis werden bei 60 Grad in 15 Minuten zerstört (sind thermolabil), während die Hämolysine der Pseudomilzbrandbazillen thermostabil sind. Für die Differentialdiagnose erweist sich ferner nach **Jaenisch** (73) auch der kulturelle Nachweis auf modifiziertem Endo-Argar (10% Pepton statt 1%, 4% Agar statt 3%) als wertvoll, erprobt an 53 verschiedenen Milzbrandstämmen. **Jaenisch** fand, daß das Wachstum saprophytischer Bakterien auf Endoagar gehemmt wird, der Milzbrandbazillus dahingegen gut zur Entwicklung kommt. Auf der Endoplatte erreichen die Milzbrandkolonien in 20—24 Stunden etwa dieselbe Größe wie auf gewöhnlichem Agar. Haarlockenbildung ist jedoch nicht so ausgeprägt, die Kolonien erscheinen daher mehr rund bis oval. Manche Pseudomilzbrandbazillen rufen eine Rötung des Nährbodens hervor und unterscheiden sich dadurch vom B. anthracis, der nicht soviel Säure bildet, daß die Reduktion des Säurekomponenten des Fuchsins beeinflußt wird. In Seidenpeptonwasser (Abderhalden) endlich wächst der Bac. anthracoides unter Trübung der Nährlösung, während der B. anthracis nicht wächst (**Weichardt** 179). Nach **Pokschischewsky** (l. c.) sollen die Pseudomilzbrandbazillen für kleinere Versuchstiere entweder überhaupt nicht oder höchstens nur für Mäuse pathogen sein, wenn sie in großen Mengen intraperitoneal injiziert werden. Ihre Virulenz nimmt durch Tierpassagen nicht zu.

Vorstehende Ausführungen dürften schon zur Genüge zeigen, mit welchen Schwierigkeiten es oft verknüpft sein kann, die Milzbranddiagnose durch die bakteriologische Untersuchung zu sichern.

Eine gründliche Kenntnis der Biologie des Milzbrander-

regers, vor allem sein gelegentliches abweichendes kulturelles Verhalten (siehe oben S. 3) verdienen besondere Beachtung.

Ohne Zweifel gibt es Fälle, die überhaupt keine absolut sichere Diagnose gestatten. Denn wer will entscheiden, ob ein nicht pathogener Bacillus, der in seinen morphologischen Merkmalen und seinen biologischen Eigenschaften im wesentlichen mit dem B. anthracis übereinstimmt und sogar eine positive Ascolireaktion gibt (Fall **Zingle** l. c.), zu den Pseudomilzbrandbazillen zu rechnen oder avirulenter Milzbrand ist? Gerade die im Fleischmehl nachgewiesenen Pseudomilzbrandbazillen werden m. E. in manchen Fällen abgeschwächte und daher in ihrem Wachstum abweichende echte Milzbrandbazillen sein. Hierauf macht auch schon **Enoch** (31) aufmerksam, der die geringe Virulenz der Milzbranderreger in den Futtermehlen darauf zurückführt, dass die Hersteller neuerdings ihre Produkte zwecks Abtötung etwaiger Milzbrandkeime erhitzen.

Nach dem eben genannten Autor läßt sich übrigens die Virulenz der abgeschwächten Milzbrandkeime aus Fleischmehl durch mehrmaliges Umzüchten in Bouillon steigern, ein Vorgang, der für die bakteriologische Milzbranddiagnostik wichtig ist.

Um vor Fehlresultaten bei der Milzbranddiagnose nach Möglichkeit gesichert zu sein, ist es daher in manchen Fällen notwendig, sämtliche Hilfsmittel der bakteriologischen und serologischen Untersuchungstechnik anzuwenden.

Zur Erzielung eines einwandfreien Untersuchungsergebnisses ist auch vor allem auf eine **zweckmäßige Entnahme, Aufbewahrung und Versendungsart des Materials** zu achten, worauf ich unten näher eingehen werde.

Außerordentlich wichtig für die bakteriologische Milzbranddiagnose ist ferner die Feststellung, daß sich unter gewissen Voraussetzungen und in bestimmten Fällen Sporen in der Milzbrandleiche bilden können.

In den meisten Lehrbüchern findet man noch die Angabe, daß der B. anthracis im Innern uneröffneter Leichen (Kadaver) wegen des Sauerstoffmangels keine Sporen bilde. Dies trifft jedoch für die Luftwege (Lunge) und den Darm nicht zu.

Daß sich in der Lunge Sporen bilden können, beweisen die Beobachtungen von **Szasz** (170), **Stemmer** (165), sowie der vom Verfasser auf Seite 11 mitgeteilte Fall.

Die Sporenbildung im Darm wurde verschiedentlich durch Versuche von **Oppermann** (120), **Schäfer** (147), **Ciuca** und **Fenea** (nach Bongert 14) bewiesen.

Oppermann stellte fest, daß die von Herbivoren aufgenommenen Milzbrandsporen im Dünndarm zu Bazillen auskeimen und diese im Coecum wieder sporulieren. Im Colon sollen sich aus einer großen Anzahl Sporen wieder Bazillen bilden, deren Zahl auf der Wanderung durch das Colon — wahrscheinlich infolge der sich dort abspielenden Fäulnisprozesse — erheblich abnimmt, so daß im Rectum nur Sporen anzutreffen sind.

Nach **Ciuca** und **Fenea** finden sich im Darminhalt kranker Tiere (Hammel, Schweine), selbst in faulen Leichen bei negativem Ergebnis der Butuntersuchung stets Milzbrandsporen, die sich durch das Plattenverfahren nach vorausgehendem Erwärmen auf 65 Grad C. nachweisen lassen.

Ferner hat **Schäfer** im Darm uneröffneter Versuchstiere in 12 von 25 Fällen Sporenbildung nachgewiesen. Diese ist wesentlich von der Außentemperatur, bei der die Kadaver gehalten werden, abhängig.

Was die übrigen **Vorbedingungen für das Zustandekommen einer Sporenbildung** betrifft, sowie die **Bedeutung des Phänomens der Sporulation** überhaupt, so ist man bisher hierüber nach **Sobernheim** (Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle-Wassermann II. Aufl. 3, 1913) noch zu keinem ganz sichern Urteil gelangt.

Nach **v. Behring** (11), **Lehmann** (96), **Fränkel** (46), **Osborne** (122) und **Kitasato** (82) tritt die Sporenbildung dann ein, wenn die Bazillen sich auf dem Höhepunkt der Entwicklung befinden. **Buchner** (16) hält die plötzliche Hemmung des Wachstums nach vorausgegangener guter Ernährung für das Wesentlichste. **Gärtner** (50) beobachtete dann eine lebhafte Sporulation, wenn die Milzbrandbazillen gut, aber nicht übermäßig ernährt wurden und hält die Sporen sowohl für eine Frucht, als auch für eine Dauerform. Ob der eintretende Mangel an Nährmaterial oder die Ansammlung von Stoffwechselprodukten den Anstoß zur Sporenbildung gibt, wagt **Gärtner** nicht zu entscheiden.

Bei meinen biologischen Untersuchungen soll daher mein Hauptaugenmerk auf diese Punkte gerichtet sein.

Zunächst möchte ich versuchen, die für die Entstehungsweise des Milzbrandes und auch für die Milzbranddiagnose sehr

wichtige Frage nach den Bedingungen, unter denen eine lebhafte Sporenbildung zustande kommt, durch verschiedene Versuchsanordnungen mit einer Reihe von Milzbrandstämmen einen Schritt der Lösung näher zu bringen.

URSACHEN DER SPORULATION DES BACILLUS ANTHRACIS.

Die Sporenbildung ist nach **Koch, v. Behring, Buchner, Schreiber** (152) u. a., abgesehen von der Natur der Milzbrandbazillen selbst, hauptsächlich vom Sauerstoffzutritt, von der Temperatur und von der Beschaffenheit des Nährbodens (Feuchtigkeit) abhängig.

Die meisten Bakteriologen stimmen darin überein, daß zur Sporenbildung aerober Bakterien der **Sauerstoff der Luft** eine sehr notwendige Bedingung ist. Die Beobachtung **Kletts**, welcher auch in einer Stickstoffatmosphäre eine Sporulation beim B. anthracis erzielt haben will, beruht nach **Weil** (181), **Jacobitz** (71) und **Slupski** (161) auf einer fehlerhaften Versuchsanordnung

Was die Höhe der zur Sporenbildung erforderlichen **Temperatur** betrifft, so können die Milzbrandbazillen nach **Weil** (180) noch bei 13 Grad C. Sporen bilden. Nach **Baumgarten** und **Kitt** (82) liegt das Temperaturoptimum für die Sporulation bei 30 Grad C. Bei einer Temperatur unter 18 Grad und über 34 Grad tritt selten Sporenbildung ein. Nach **v. Behring** (l. c.) erfolgt die Sporulation am schnellsten bei einer Temperatur über 20—30 Grad.

Nach **v. Esmarch** (33) soll das **Tageslicht** die Sporenbildung verhindern. **Eberle** (26) vermochte jedoch einen nachteiligen Einfluß von diffusem Tageslicht auf die Sporulation nicht zu konstatieren.

Der Einfluß des **Nährbodens** spielt bei der Sporulation eine besonders wichtige Rolle. Findet ein dauerndes, lebhaftes Wachstum unter den günstigen Bedingungen statt, wie in eiweißreichen flüssigen Nährböden von schwach akalischer Reaktion z. B. im flüssigen Blutserum **v. Behring** (l. c.), so beobachtet man niemals Sporenbildung.

Ebenso wird natürlich die Sporenbildung fraglich, wenn von vornherein eine ungenügende Ernährung der Bazillen oder eine Störung ihres Wachstums stattfindet. Bei saurer oder zu

stark alkalischer Reaktion des Nährbodens ist nach **Gärtner** (l. c.) keine Sporenbildung möglich. (So kommen schließlich durch fortgesetzte Züchtung in besonderen Nährböden — Glyzerinagar usw. — die asporogenen Stämme zustande). Auch der Salpeter sowie die Ammonverbindungen hemmen die Entwicklung (**Gärtner**). Der Salzgehalt der meisten Harne soll nach **v. Behring** (l. c.) ein milzbrandschädliches Agens sein.

Eine plötzliche Hemmung des Wachstums dahingegen nach vorausgegangener guter Ernährung hat eine schnelle und vollständige Sporenbildung zur Folge (**Buchner** l. c., **Schreiber** l. c.). Nach **Gärtner** (l. c.) sollen Nährsubstrate mit reichlichem Stickstoffgehalt die Entwicklung der Milzbrandbazillen und -Sporen begünstigen, wenn Kohlenstoff zugeführt wird. Kohlenstoffhaltige Zusätze schaden aber, wenn das Nährmaterial an Stickstoffsubstanzen arm ist, **Turrò** (l. c.) und **Sobernheim** (l. c.) konnten eine große Menge Sporen erzielen durch Übergießen von Agarplatten mit bazillenhaltiger Bouillon. **Buchner** bekam auf gekochten Kartoffeln reichlich Sporen.

Als Substanzen, welche die Sporenbildung befördern, weil sie das Wachstum hemmen, hat **v. Behring** (1889) angegeben: Kalkwasser (0,05%), Calciumchlorid (1 : 200). Nach **Schreiber** (l. c.) sollen den gleichen Effekt auch Natr. carbon., Magnes. sulfuric., Na Cl und destilliertes Wasser hervorbringen. Die gleiche Beobachtung machten auch schon **v. Behring** (l. c.) und **Buchner** (l. c.). Nach **v. Behring** werden z. B. durch Verdünnung des Blutserums mit Wasser — 100 fach — für die meisten Fäulnisbakterien (besonders für die Anaërobier) die Wachstumsbedingungen immer ungünstiger, dahingegen für die Enwickelung der Milzbrandbazillen mit Sporenbildung immer günstiger, sodaß bei gleichzeitiger Aussaat die letzteren die Oberhand gewinnen.

Auch durch kohlensauren Kalk, welcher die Säuren bindet, wird eine Förderung der Sporulation bedingt (in Milzbranddistrikten häufig kalkhaltiger Untergrund — **v. Behring** l. c.) Nach **Buchner** (l. c.) fördert 2% Na Cl in Peptonfleischextraktlösung den Sporulationsprozeß, 4% Na Cl verringert und 6% Na Cl hebt die Sporenbildung auf.

Eine für die Hygiene und Seuchenbekämpfung sehr lehrreiche Beobachtung machte ferner **Soyka** (163). Er befeuchtete Quarzsand von 0,2 mm Durchmesser in verschiedenem Grade mit schwach alkalischer Bouillon, in welcher Milzbrandbazillen

verteilt waren, und fand, daß die Sporenbildung der Bazillen in dem feuchten Boden viel rascher erfolgte, als in der reinen Nährflüssigkeit. Er konnte dabei feststellen, daß ein bestimmter nicht zu hoher Feuchtigkeitsgrad ähnlich beschleunigend auf die Sporulation wirkte, wie innerhalb gewisser Grenzen die Temperatur. In 3 Tagen hatten sich bei 20 bis 24 Grad C. im Boden schon massenhaft Sporen gebildet.

Diese von **Jacobsthal** und **Pfersdorff** (72) und auch von mir bestätigte wichtige Entdeckung der Eigentümlichkeit des B. anthracis auf der Oberfläche poröser, mit Nährflüssigkeit getränkter Substanzen schneller zu sporulieren als in flüssigen oder halbflüssigen guten Nährsubstraten, wird jetzt praktisch in der Weise ausgenützt, daß man zum Zwecke des Verschickens von milzbrandverdächtigem Material an ein Laboratorium nach Angabe von **Forster** = Straßburg und seinen Schülern (104, 116) feuchte Gipsstäbe mit dem zur Untersuchung bestimmten Material bestreicht.

Das früher von **Olt** zur Herbeiführung einer schnelleren Sporulation empfohlene Verfahren, milzbrandverdächtiges Material (Blut) auf die eine Bruchfläche einer gekochten Kartoffel zu streichen, die beiden Kartoffelhälften hiernach wieder zusammenzuklappen und, mit der nötigen Schutzhülle versehen, an den Bestimmungsort zu senden, hat wenig Anklang gefunden, weil häufig ein Überwuchern der Milzbrandkeime durch ungemein rasch wachsende Erdbazillen, deren Sporen bei 100 Grad C. nicht abzutöten sind, beobachtet wird.

Um die Milzbrandbazillen gegenüber den anderen Keimen, namentlich den Fäulnisbakterien, zu begünstigen, empfehlen **Jacobsthal** und **Pfersdorff** (l. c.) das Milzbrandblut auf sterilisierte, vierkantige Gipsstäbchen, die in starkwandigen Glasröhrchen auf Watte ruhen und zur Beschleunigung der Sporulation mit Bouillon getränkt sind, in dünner Schicht aufzustreichen.

Die Gipsstäbchenmethode haben zuerst **Marxer** (104), **Jacobsthal** und **Pfersdorff** (l. c.), sowie **Eberle** (l. c.) ausführlich beschrieben. Hier sei nur kurz erwähnt, daß mit Blut oder Organsaft kranker Tiere bestrichene, vorher mit Wasser angefeuchtete Gipsstäbe bei Zimmertemperatur (18 bis 22 Grad C.) vor Licht geschützt aufbewahrt und am zweiten oder dritten Tage nach der Entnahme des Materials auf das Vorhandensein von Milzbrandbazillen bezw. -Sporen untersucht werden. Dies

geschieht in der Weise, daß das verdächtige Material vom Gipsstäbchen mit einem sterilen Platinspatel abgekratzt und in zwei Röhrchen mit Nährbouillon gebracht wird, von denen eins zwei Minuten auf 65 Grad C. erhitzt (um die etwa beigemischten Bakterien aus der Coli- und Proteusgruppe abzutöten) und das zweite einer 10 Minuten dauernden Erhitzung auf 65 Grad C. unterworfen wird (um alle vegetativen Bakterienformen zu töten). Von jedem der beiden Bouillonröhrchen werden 3 Agarplatten in den bekannten Verdünnungen angelegt. Gleichzeitig wird mit dem 2 Minuten lang erhitzten Material eine Maus geimpft.

Wurden die in der oben angegebenen Weise präparierten, mit Milzbrandbazillen enthaltendem Material beschickten Gipsstäbe bei Zimmertemperatur aufbewahrt, wodurch ein Überwuchern durch andere Bakterien nach Möglichkeit verhindert werden sollte, so konnten noch nach 14 Monaten Milzbrandsporen nachgewiesen werden (**Marxer** l. c.)

Nach **Eberle** (l. c.) sollen auch noch andere poröse Stoffe, besonders Pappe, nach **Reinecke** (137) auch kleine gebrannte Ziegelstückchen denselben Zweck erfüllen wie die Gipsstäbe. **Schüller** (Zeitschr. f. Hyg. d. Haustiere, Bd. 5, 1908) zieht angefeuchtete, kleinfingerstarke Fließpapierrollen vor, die schwach mit Milzbrandblut getränkt in Glasröhrchen versandt werden, weil bei den Gipsstäbchen zuweilen Verschimmelung vorkommen soll.

Grabert (57), **Dammann** und **Freese** haben die Schüllersche Methode nachgeprüft und sind zu dem Ergebnis gelangt, daß sie der Gipsstäbchenmethode überlegen sei. **Müller** und **Engler** (116) sowie **Foth** und **Wulff** (43, 188) haben jedoch bei der Nachprüfung entgegengesetzte Resultate erzielt. **M. Müller** und **Engler** (l. c.) fanden feuchten Thon oder feuchte Kreide als Substrat zum Auftragen von Milzbrandmaterial für den späteren biologischen Milzbrandnachweis als besonders geeignet. Auf diesen Substraten soll nach ihnen die Sporulation der in ihrer Vitalität geschwächten Milzbrandkeime wesentlich schneller vor sich gehen als auf Gips und Fließpapier.

EIGENE VERSUCHE.

Um die sich widersprechenden Angaben über die beste Methode, Milzbrandmaterial zum Zwecke der späteren Untersuchung zu konservieren, aufzuklären und um gleichzeitig über den Einfluß einer ganzen Reihe poröser Substrate, die für den

Versand von Blut- oder Organausstrichen, als Baumaterialien etc. in Frage kommen, auf die Sporulation ein Urteil zu gewinnen, prüfte ich außer Gips auch weiße Kreide, ferner eine Anzahl Gesteine, Pappe verschiedener Herkunft und Zusammensetzung, Fließpapier (Filtrierpapier), Holzkohle und Torf. Diese Stoffe wurden bei 140 Grad sterilisiert und hierauf zum Vergleich einmal mit Leitungswasser und bei den Versuchen II — IV mit verschiedenen Nährlösungen getränkt, dann im strömenden Wasserdampf sterilisiert.

Von den mit Milzbrandmaterial dünn bestrichenen Substraten wurden von Zeit zu Zeit, wie in den Tabellen angegeben, kleine Mengen mit einem sterilen Platinspatel abgekratzt und mittels einer angefeuchteten, sterilen Platinöse möglichst gleichmäßig in einem Bouillonröhrchen verteilt. Aus diesem wurden dann mit derselben Platinöse die üblichen Verdünnungen in flüssigem Agar angelegt, die 10 Minuten auf 65 Grad C. erhitzt und zu Platten verarbeitet wurden.

I. Sporulationsversuch mit Bacillus anthracis bei Zimmertemperatur.

Die mit Leitungswasser getränkten porösen Substrate wurden mit Blut einer an Milzbrand kurz vorher gestorbenen Maus bestrichen.

Material	Sporenbildung nach Tagen				
	1	2	3	4	5
Gips	×	×	××	×	×
Kreide	—	×	×	×	×
Ziegelstein	—	—	×	×	×
Thon	—	—	—	—	—
Sandstein	—	—	—	×	×
Graue Pappe	—	—	×	×	×
Strohpappe	—	—	—	—	—
Fließpapier	—	×	×	×	×
Holzkohle	×	×	×	××	××

×× bedeutet: Sporen in größerer Anzahl gebildet.
× bedeutet: nur einzelne Sporen.
— bedeutet: keine Sporenbildung.

II.

Sporulationsversuch mit B. anthracis.

Die mit Nährbouillon völlig getränkten Substrate wurden mit dem Herzblut eines etwa 6 Stunden zuvor an Milzbrand gestorbenen Kaninchens dünn bestrichen und bei Zimmertemperatur (18—22 Grad C.) vor Licht geschützt aufbewahrt.

Material	Sporenbildung nach									
	18	24	30	36	42	2	3	4	5	6
	Stunden					Tagen				
Gips	—	XX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
Kreide	—	X	XX	XX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
Kalkstein	—	—	XX	XX	XX	XX	XX	XXX	XX	XXX
Phosp. Kalk	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ziegelstein	—	X	X	X	XX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
Thonmergel	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gebr. Thon	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sandstein	—	—	—	—	X	X	X	X	XX	X
Bimsstein	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Graue Pappe	—	—	—	—	—	—	—	XX	XX	XX
Holzpappe	—	—	—	—	—	X	X	XX	XX	XX
Strohpappe	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fließpapier	—	—	X	XX	XX	XX	XXX	XX	XX	XX
Holzkohle	X	XX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
Torf	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

XXX bedeutet: Sporen in großer Anzahl (über 100 Kolonien) nachgewiesen.

XX bedeutet: 10—100 Kolonien aufgegangen.

X bedeutet: vereinzelte Sporen gebildet.

— bedeutet: keine Sporenbildung.

III.

Sporulationsversuch mit B. anthracis bei Zimmertemperatur.

Die mit einer eiweißfreien Nährlösung (Aqua dest. 1000,0 Natr. chlorat. 5,0; Natr. phosphoricum 2,0; Ammonium lacticum 6,0 und Asparagin 4,0) getränkten Substrate wurden mit dem Herzblut einer 28 Stunden nach der Impfung mit Sporenmaterial an Milzbrand gestorbenen Maus bestrichen.

Material	Sporulation nach									
	18	24	30	42	48	$2^1/_2$	3	4	5	6
	Stunden					Tagen				
Gips	-	×	×	××	××	×××	×××	×××	×××	×××
Kreide	—	×	×	××	××	××	××	×××	××	×××
Ziegelstein	—	—	×	×	×	××	××	××	××	××
Gebr. Thon	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sandstein	—	—	—	×	×	×	×	×	×	×
Graue Pappe	—	—	—	—	—	—	—	—	×	××
Holzpappe	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Strohpappe	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Filtrierpapier	—	×	×	×	××	××	××	××	××	××
Holzkohle	×	××	×	××	××	××	×××	×××	×××	×××
Torf	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

××× bedeutet: Sporen in großer Anzahl (über 100 Kolonien) nachgewiesen.

×× bedeutet: 10—100 Kolonien aufgegangen.

× bedeutet: vereinzelte Sporen gebildet.

— bedeutet: keine Sporenbildung.

IV.

Sporulationsversuch mit Bacillus anthracis.

Die mit physiologischer Kochsalzlösung (0,8%) getränkten Substrate wurden mit fauligem Blut und Milzbrei einer mit Milzbrandkultur geimpften, 30 Stunden vorher gestorbenen Maus dünn bestrichen und bei Zimmertemperatur gehalten.

Material	Sporenbildung nach							
	18	24	30	42	54	78	4	5
	Stunden						Tagen	
Gips	—	×	×	×	××	××	××	××
Kreide	—	—	×	×	×	××	××	×
Ziegelstein	—	—	—	—	—	—	—	—
Gebrannter Thon	—	—	—	—	—	—	—	—
Sandstein	—	—	—	—	—	—	—	—
Graue Pappe	—	—	×	×	×	×	××	××
Holzpappe	—	—	—	—	—	×	×	×
Strohpappe	—	—	—	—	—	—	—	—
Fließpapierrollen	—	—	×	×	×	×	×	×
Holzkohle	×	×	×	××	××	××	××	××
Torf	—	—	—	—	—	—	—	—

×× bedeutet: Sporenbildung reichlicher.
× bedeutet: vereinzelte Sporen nachgewiesen.
— bedeutet: keine Sporenbildung.

Da die Oberfläche der zu den Sporulationsversuchen verwendeten Materialien nach der Durchtränkung mit Flüssigkeit ein sehr verschiedenes Aussehen hatte (z. B. Gips, Kohle und Kreide feuchtmattglänzend; die Pappen saftig glänzend und der Ton eine trockene Beschaffenheit zeigte), so mußte man annehmen, daß diese Substrate eine große Verschiedenheit in der Aufnahmefähigkeit für Wasser besaßen. Um den Feuchtigkeitsgrad, der ohne Zweifel einen wesentlichen Einfluß auf die Sporenbildung hat, genauer in Prozenten angeben zu können, bestimmte ich die Wasseraufnahmefähigkeit der verschiedenen Stoffe, deren Trockengewicht nach einem längeren Aufenthalt im Trockenschrank bei 110 Grad C. festgestellt wurde. Die betr. Materialien wurden in Wasser gelegt, darin so lange gelassen, bis keine Gewichtszunahme mehr erfolgte.

Bestimmung der Wasseraufnahmefähigkeit

der verschiedenen zu Sporulationsversuchen verwendeten porösen Substrate.

Material	Trockengewicht	Gewicht nach vollständiger Sättigung mit Wasser	Aufnahmefähigkeit in Prozenten des Trockengewichts
Gips	5.94 g	8.62 g	45.3 %
Kreide	8.57 „	10.8 „	26.0 %
Kalkstein	14.2 „	15.19 „	6.9 %
Phosphors. Kalk	3.69 „	4.52 „	22.5 %
Ziegelstein	12.95 „	15.35 „	18.5 %
Thonmergel	7.9 „	19.79 „	150.5 %
Gebrannter Thon	8.77 „	10.3 „	17.4 %
Sandstein	22.55 „	24.02 „	6.07 %
Bimsstein	5.64 „	7.35 „	30.5 %
Graue Pappe	5.22 „	15.6 „	198.8 %
Holzpappe (Hygrosit)	3.92 „	13.26 „	238.2 %
Strohpappe	3.82 „	11.9 „	211.5 %
Fließpapierrollen	3.31 „	11.26 „	250.8 %
Holzkohle	2.47 „	6.17 „	149.8 %
Torf	1.92 „	12.94 „	573.9 %

Vergleichende Bestimmungen des Porenvolumens der genannten Stoffe wurden nicht vorgenommen, weil verschiedene Substrate nach Sättigung mit Wasser eine erhebliche Zunahme ihres Volumens aufwiesen.

Daß der Feuchtigkeitsgrad des Mediums von großem Einfluß auf die Sporenbildung ist, konnte bereits **von Esmarch** (33) nachweisen. Wurden Hautstücke von an Milzbrand gestorbenen Tieren durch festen Verschluß der Petrischalen oder Einlegen von feuchtem Fließpapier bei 22 bis 37 Grad C. feucht gehalten, so konnten mit Sicherheit Sporen nachgewiesen werden. Bei niedrigem Feuchtigkeitsgehalt und Abschluß von Feuchtigkeit entwickeln sich keine Sporen.

Zur Bestimmung des **Feuchtigkeitsoptimus,** bei dem die lebhafteste Sporulation stattfindet, wurden 5 gr schwere, in Reagenzgläsern befindliche sterilisierte Fließpapierrollen mit 1, 2, 3, 4, 5 usw. ccm Nährbouillon getränkt, dann dünn mit Herzblut einer Milzbrandmaus bestrichen und bei Zimmertemperatur gehalten. Vier Tage später konnten nach der auf S. 20 angegebenen Methode auf der Oberfläche der mit 20 % und 40 % Nährflüssigkeit befeuchteten Rollen nur ganz vereinzelte Sporen nachgewiesen werden. Bei 60 % Feuchtigkeit stieg die Anzahl der gebildeten Sporen bereits erheblich und erreichte bei etwa 100 % den Höhepunkt. Nimmt man statt Nährflüssigkeit zur Anfeuchtung des Fließpapiers gewöhnliches abgekochtes Wasser, so kann eine lebhafte Sporulation auch bei einem höheren Feuchtigkeitsgrad (Sättigung mit Wasser) stattfinden.

Vergleicht man die in den Versuchen I—IV erzielten Ergebnisse der Sporenbildung miteinander, so fällt sofort auf, daß durchaus nicht alle porösen Substrate zur Sporulation des Milzbrandbazillus gleich geeignet sind. Am schnellsten wurden durchweg eine größere Menge Sporen erzeugt auf den Holzkohlescheiben, dann folgt unmittelbar Gips, an dritter und vierter Stelle stehen Kreide und Filtrierpapierrollen, an letzter Stelle Ziegelstein, Sandstein und graue Pappe.

Die Bildung großer Mengen Sporen auf der Holzkohle ist wohl durch die Wirkung des in den Poren derselben aufgespeicherten Luftsauerstoffs zu erklären. Wegen der Eigenschaft der Holzkohle, namentlich der frisch geglühten, Gase zu absorbieren bezw. zu kondensieren, wird diese von alters her als

Mittel zur Zerstörung von üblen Gerüchen und als Desinfektionsmittel benutzt. Es werden nicht nur die in die Poren der Kohle aufgesogenen Fäulnisprodukte mechanisch gebunden, sondern können auch vielleicht durch den von der Kohle aufgenommenen Luftsauerstoff oxydiert und unschädlich gemacht werden. Aus diesem Grunde dürfte sich die Holzkohle vorzüglich zum Versand von schon in Fäulnis übergegangenem Milzbrandmaterial eignen. Der Versuch IV zeigt, daß die Isolierung der Milzbrandkeime in Form von Sporen aus faulendem Blut und Organsaft tatsächlich ebensogut, wenn nicht eher, gelingt, als mit irgend einem anderen bisher verwandten porösen Substrat.

Ferner zeigte es sich bei sämtlichen Versuchen, daß die von **Eberle** (l. c.) dem Gips als sporulationsbeförderndes Mittel gleichgestellte Pappe keineswegs immer zu diesem Zweck geeignet ist. Dem Gips ziemlich nahe stand noch die graue Pappe, auf der einmal nach 30 Stunden, ein anderes Mal nach 4—5 Tagen in größerer Anzahl Sporen nachgewiesen werden konnten, wohingegen auf Holzpappe (Hygrosit) nur ganz vereinzelte Sporen gebildet wurden und auf Strohpappe überhaupt keine Sporulation zustande kam. Erst dann, wenn die Strohpappe durch Auskochen in destilliertem Wasser von den darin befindlichen Schädlichkeiten, die vielleicht bei der Fabrikation (Sulfitlauge) hineingelangt waren, befreit wurde, konnten die mit dem Blut darauf ausgestrichenen Milzbrandbazillen sporulieren.

Das Ausbleiben der Sporenbildung auf ausgeglühtem Knochen, Bimsstein und auf gebranntem Thon (weißem Pfeifenthon, Blumentopfscherben) erkläre ich mir durch die allzugeringe Feuchtigkeit der Oberfläche dieser Substrate.

Auf Torf verhinderten wahrscheinlich die in demselben vorhandenen Humussäuren (Huminsäure, Ulminsäure, Geïnsäure usw.) die Sporenbildung.

Die oben S. 17 erwähnte Beobachtung, daß vorher gut ernährte (z. B. aus dem Blut, Bouillonkulturen stammende) und dann in Wasser verimpfte Milzbrandbazillen alsbald zu sporulieren beginnen (**Buchner, v. Behring**), sowie die Tatsache, daß sich die Sporulation durch poröse Substrate, d. h. durch vermehrte Sauerstoffzufuhr, beschleunigen läßt, spricht m. E. wohl dafür, daß in erster Linie der Nährstoffmangel, oder besser gesagt die plötzlich einsetzende Verschlechterung der Ernährung, die

Bazillen zwingt, Sporen zu bilden. Wären ihre Stoffwechselprodukte die Ursache der Sporenbildung, so müßten die Bazillen doch schneller in den Nährböden sporulieren, denen man Stoffwechselprodukte (beim B. anthracis z. B. Essigsäure, Capronsäure, Schwefelwassenstoff) zugesetzt hat. Dies ist aber nach den Beobachtungen von **Behring** (l. c.) u. a. durchaus nicht der Fall. Gerade das Gegenteil trifft zu. Bindet man die vom Milzbrandbazillus gebildeten Stoffwechselprodukte durch 0, 05% iges Kalkwasser, Kreide (**Behring**), Natr. carbon. (**Schreiber**), so erfolgt rasch Sporenbildung.

Auch der folgende, vom Verfasser angestellte Versuch dürfte zur Klärung dieser Streitfrage wesentlich beitragen. Mit Herzblut einer an Milzbrand gestorbenen Maus wurde Nährbouillon beschickt, in der bereits 10 Generationen von Milzbrandkulturen gewachsen waren, die also sicher Stoffwechselprodukte in großer Menge enthalten mußte. Den zu diesem Versuch verwendeten Nährboden bereitete ich in der Weise vor, daß die Bouillon jedesmal, nachdem eine Milzbrandgeneration darin bei Brutemperatur etwa 8 Tage lang gewachsen war, durch Thonkerzen filtriert wurde. In der auf diese Weise präparierten keimfreien Bouillon konnte jedoch trotz reichlichen Wachstums keine raschere und lebhaftere Sporulation beobachtet werden, als in den Kontrollkulturen.

Aus den **Ergebnissen der Sporulationsversuche** lassen sich für die Praxis weiter folgende Nutzanwendungen ableiten:

Um die von **Bongert** u. a. beobachtete schädigende Wirkung der Fäulnisprodukte auf die Milzbrandbazillen von dem Zeitpunkt der Entnahme des Materials ab auszuschalten und um gleichzeitig eine möglichst schnelle Sporulation zu erreichen, dürfte die Kohlenstäbchenmethode besonders geeignet sein. Auf Holzkohle habe ich auch bisher noch kein Überwuchern durch Begleitbakterien beobachtet.

Man verwendet am besten vierkantige, mit der Laubsäge hergestellte, 8—10 cm. lange Kohlenstäbe mit etwa 1,5 cm. breiten Seitenflächen. Zur bequemeren Herausnahme aus den starkwandigen, unten zugeschmolzenen Glasröhrchen empfiehlt es sich, dieselben in der Längsachse zu durchbohren und durch diesen Kanal einen am oberen Ende mit einer Öse versehenen Aluminiumdraht zu ziehen. Alle vier Seitenflächen können mit dem ver-

dächtigen Material bestrichen werden. Man bezeichnet die einzelnen Flächen dementsprechend am oberen Ende mit: B = Blut, M = Milz, L = Lunge, D = Ausstrich aus einem hämorrhagisch geschwollenen Lymphknoten usw.

Diese Kohlenstäbe werden wie S. 18 angegeben vorbehandelt und ruhen auf am Boden des Röhrchens befindlicher Watte.

Es empfiehlt sich, die Prüfung von faulem, milzbrandverdächtigen Material erst etwa 3--4 Tage nach der Entnahme vorzunehmen, da möglicherweise die Sporulation der durch die Fäulnistoxine geschädigten Milzbrandbazillen erst dann so weit vorgeschritten ist, daß sie eine 10 Minuten dauernde Erhitzung auf 65 Grad C. zum Zwecke der Abtötung von überwuchernden Begleitbakterien aushalten können.

Der **Ausfall des Untersuchungsergebnisses** ist, wie auf S. 14 bereits erwähnt, wesentlich von einer **zweckmäßigen Entnahme, Aufbewahrung und Versendungsart des zur Nachprüfung bestimmten Materials** abhängig.

Wenn man die oben geschilderten biologischen Eigentümlichkeiten des B. anthracis beachtet und die verschiedenen Möglichkeiten der pathologisch-anatomischen Veränderungen bei den einzelnen Milzbrandformen berücksichtigt, so wird man individualisieren lernen und nicht nach einem bestimmten Schema die Proben entnehmen, wie es z. B. durch das Reichstierseuchengesetz (Anlage zu § 9 der Ausführungsbestimmungen) vorgeschrieben ist.

Nach meinem Dafürhalten muß in erster Linie Wert darauf gelegt werden, Material zum Zwecke einer Nachprüfung der Milzbranddiagnose auf Grund des pathologisch-anatomischen Befundes zu entnehmen (also veränderte Lymphknoten aus der Umgebung des Primärherdes, Milzinfarkte etc.) bezw. bei vorgeschrittener Fäulnis im Falle von Milzbrandsepsis, wie auf S. 15 angegeben, vorzugsweise Material aus Lunge und Coecum- bzw. Rectuminhalt einzusenden.

Wenn die Leiche erst wenige Tage gelegen hat, so ist es auch möglich, in peripheren Venen oder im Liquor cerebrospinalis (**Pollak** 132, **Praetorius** 134) Milzbrandbazillen nachzuweisen. Am längsten sollen sich dieselben nach **Wulff** (188) und **Pfeiler** (125) im Knochenmark lebensfähig erhalten.

Nach **Ciuca** und **Stoicescu** sowie **Pfeiler** und **Neumann** (**Bongert** 14) soll die Haut, in der die Bedingungen zur Sporenbildung sehr günstig sind, zum kulturellen Nachweis des

Milzbrandes ganz besonders geeignet sein. Sie empfehlen, ein Hautstück zu trocknen, abzuschaben und das zerkleinerte Material in Bouillon 30 Minuten lang bei 60—75 Grad C. zu erhitzen und dann zu Platten zu verarbeiten.

Um in **tierischen Rohstoffen, Wasser usw. Milzbrandsporen** nachzuweisen, empfiehlt sich die von **Gruber** (nach **Bongert,** 14, S. 232) angegebene Methode: Herstellung einer Aufschwemmung des Untersuchungsmaterials in Bouillon. Diese hält man einige Zeit bei Bruttemperatur unter Sauerstoffabschluß, um die Oedembazillensporen zum Auskeimen zu bringen. Zur Abtötung der ausgewachsenen Bazillen wird die Kultur hierauf $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde auf 70 Grad C. erhitzt. Die durch die Erhitzung nicht geschädigten Milzbrandsporen sind nun durch Impfung und Kultur leicht nachzuweisen.

Zur Abtötung der saprophytischen Begleitbakterien empfehlen **Jaenisch** (l. c.), **Engler** (l. c.), **Szasz** (170) u. a. das aufgeschwemmte Material 10 Minuten auf 65 Grad C. zu erhitzen. **Glynn** und **Lewis** (53) halten es für richtiger, die Aufschwemmung 15 Minuten lang, und **Enoch** (l. c.) 1 Stunde lang bei 75—80 Grad C. zu halten.

Die von **Enoch** angegebene Methode zum Nachweis von Milzbrandsporen in Futtermitteln (besonders Fleischmehlen) ist der von mir angewandten (S. 11) ähnlich. Der Hauptunterschied besteht darin, daß der dünnflüssige Brei nach E. durch ein engmaschiges Metallsieb geschüttet, nach dem Absetzenlassen abpipettiert und schließlich zentrifugiert wird. Die im Sediment enthaltenen Keime werden zu Agarplatten verarbeitet und nach Anreicherung in Bouillon an Mäuse verimpft. Diese Versuchsanordnung soll nach **Meyer** (109) in Verbindung mit der Kultur auf modifiziertem Endoagar (S. 13) zum Nachweis von Milzbrandsporen in Futtermitteln sich vorzüglich eignen.

Um Milzbrandsporen in Wolle und Tierhaaren aufzufinden, übergießt man nach **Eurich** (34) das Material in einem Kolben mit 50 bis 100 ccm Aqua dest., fügt 3—5% einer 5%igen Kalilauge hinzu, erhitzt 2 Minuten auf 80 Grad C. und impft dann in flüssigen Agar von 80 Grad C.

Die Feststellung von Milzbrandsporen in Erde, im Wasser und Schlamm wird nach **v. Gonzenbach** (54) und **Szasz** (l. c.) durch Erhitzen des Zentrifugats nach vorherigem Auswaschen erleichtert.

Man kann die Saprophyten auch ausschalten durch Behandlung des Untersuchungsmaterials mit einer 2—3%igen Antiforminlösung (**Uhlenhuth**) oder nach **Danèk** (24) durch Ausschütteln mit Petroläther und Pentan. Durch letztere Methode findet eine Anreicherung an der Grenze zwischen beiden Flüssigkeiten statt.

Was die **Aetiologie des Milzbrandes** betrifft, so ergeben sich aus dem eingangs geschilderten Verhalten seines Erregers außerhalb des Tierkörpers und nach den Ergebnissen der angestellten Versuche die mannigfachsten Möglichkeiten für die Entstehung dieser gefürchteten Tierseuche.

Als wichtigste aetiologische Momente spielen für den Einzelfall neben der Virulenz der Milzbrandbazillen ihre Fähigkeit, sich ungemein schnell zu vermehren und auf geeigneten Substraten mehr oder weniger reichlich resistente Sporen zu bilden eine Rolle.

Die plötzlichen Todesfälle — fulminanter, apoplectiformer Milzbrand — erklären sich nach **Toussaint** (wie **Bollinger** 12 angibt) als Folge einer Verstopfung (Aufstauung, Thrombosierung) der Gefäße lebenswichtiger Organe (Gehirn, Herz, Lunge) durch große Mengen von Bazillen.

Das auf der Höhe der Erkrankung bei Milzbrandsepticaemie gewöhnlich ungeheure Mengen von Bazillen enthaltende Blut, die blutigen Se- und Exkrete (Milch, Harn, Kot usw.) milzbrandkranker Tiere, sowie Teile gestorbener Tiere (Häute, Borsten, Fleisch, Knochenmehl etc.) bilden in den meisten Fällen den Ausgangspunkt zu neuen Infektionen.

Während die Milzbrandbazillen in der Regel nur von Wunden der äußeren Haut (Insektenstiche, Kratzen mit infizierten Fingernägeln usw.) aus eine Pustula maligna bezw. einen Milzbrandkarbunkel erzeugen oder von der Schleimhaut aus (Zunge — Glossanthrax, von den Tonsillen — **Wood** 186) infizieren, können die Sporen vermöge ihrer Widerstandskraft dem sauren Magensaft gegenüber auch vom Darm aus, nachdem sie im Duodenum zu Fäden ausgekeimt sind, in den Körper eindringen. In den Lymphknoten und in der Milz werden die Milzbrandkeime nach

Birch-Hirschfeld längere Zeit festgehalten und können sogar, falls sie keine allzugroße invasive Kraft besitzen, dort durch die Abwehrkräfte des Körpers (Phagocyten, Alexine) abgetötet werden. Auf diese Weise kann es zur Ausheilung des inneren Milzbrandes kommen.

Wenn sich die Beobachtung **Oppermanns** (S. 15), daß die Milzbrandbazillen im Coecum, vielleicht auch im Rectum, der Herbivoren sporulieren können, bestätigen sollte, dann wäre damit eine einfache Erklärung für das Auftreten des sporadischen intestinalen Milzbrandes gefunden. Es müßten sich dann aber auch im Kot gesunder Rinder, die der Infektion nicht erlegen sind, weil die aufgenommene Sporenmenge zu gering war, gelegentlich Milzbrandsporen nachweisen lassen.

Den **intestinalen Milzbrand** beobachtet man am häufigsten in der wärmeren Jahreszeit oder nach Überschwemmungen und namentlich bei Rindern, Schafen und Pferden auf der Weide (**Nocard** 118, **Schramm** 151, **Soyka** 163, **Kehoe** 78 u. a.), auch nach Verfütterung milzbrandsporenhaltiger Futtermittel (Fleischmehl, russischer Gerste etc.) oder Trinkwasser (Abwässer von Gerbereien usw.)

Die **Entstehung des enzootischen Milzbrandes** hängt nach **Bollinger** (l. c.) im allgemeinen ab:

1. von einer Infektion des Bodens mit Milzbrandvirus;
2. von einer bestimmten feuchten Beschaffenheit des Bodens;
3. von einem Sinken der Bodenfeuchtigkeit und
4. von einer gewissen Höhe der Temperatur.

Diese Bedingungen, welche von **Bollinger** für das Zustandekommen gehäufter Milzbrandfälle beim Weidevieh aufgestellt sind, bevor man eine genaue Kenntnis von der Biologie des B. anthracis hatte, stimmen auffallend mit den Bedingungen für das Zustandekommen einer reichlichen Sporenbildung, nämlich poröses Substrat (Boden), etwa 50—150% Feuchtigkeit und eine Temperatur von ca. 18—30 Grad C., wie sie im Sommer nicht selten beobachtet wird, überein. Es dürfte daher hier wohl ein ursächlicher Zusammenhang anzunehmen sein. Daß zum Zustandekommen des intestinalen Milzbrandes die Aufnahme einer großen Menge Sporen erforderlich ist, haben die Versuche **Kitts, Bollingers** und **Oppermanns** (l. c.) bewiesen. Diese Mengen fallen freilich dem Auge kaum auf, da eine Milliarde Sporen nur 1 cbmm

ausfüllen (**Oppermann**). **Kitt** und **Bollinger** vermochten mit einer linsengroßen Menge Sporen ein Schaf sicher tödlich zu infizieren. Um kleine Versuchstiere durch stomachikale Applikation zu töten, sind nach Oppermann wenigstens 300000 bis 500000 Sporen erforderlich.

Daß von den Tieren, die auf demselben Terrain weiden, erfahrungsgemäß immer nur einzelne an Milzbrand sterben, erklärt sich leicht dadurch, daß gerade diese Gelegenheit finden, größere Mengen Sporen mit der Nahrung aufzunehmen (**Oppermann** l. c.).

Das häufigere Auftreten des Milzbrandes infolge von Dürre oder Ueberschwemmung hat eben seinen Grund darin, daß auf diese Weise günstigere Bedingungen für die Sporenbildung und Verbreitung der früher einmal (durch Blut, blutigen Harn, infizierten Dünger, verscharrte Tierleichen, unaufgeschlossenes Knochenmehl— **Nocard** [118] usw.) in den Boden gelangten Milzbrandkeime gegeben sind. Wenn die oberflächliche Schicht des lockeren Erdbodens austrocknet, so können die, vielleicht durch Maulwürfe, Wühlratten, Regenwürmer usw. an die Oberfläche gebrachten Milzbrandsporen leichter durch den Wind, durch Insekten u. a. über eine größere Weidefläche zerstreut werden.

Dalrymple (23), **Kehoe** (78) u. a. machen auch darauf aufmerksam, daß der Milzbrand durch die Exkremente fleischfressender Tiere — Hunde, Katzen, Schweine, Hühner usw. — weiter verbreitet werden kann. Ferner weisen sie auf die Verbreitung durch Fliegen, an deren Füßen und Leibern Milzbrandkeime sehr leicht haften können, hin. Als solche kommen hier vorzugsweise in Betracht die Musciden (Musca vomitoria, M. cadaverina, Sarcophaga carnaria), besonders die blutsaugenden Tabaniden (Bremsen): Tabanus bovinus, Stomoxys calcitrans und von den Culiciden die Simulia-Arten, deren Larven im Wasser leben.

Vor allem dürften aber auch die in tierischen Exkrementen lebenden Dungkäfer (Emus hirtus, Familie der Coprophaginae: besonders Trox-, Aphodius-, Geotrupes-, Onthophagus- und Copris-Arten), die Aaskäfer (Necrophorus-, Necrodes-, Thanatophilus-, Silpha-, Ontholestesarten u. a.), die Speckkäfer (Dermestiden: z. B. der in ungegerbten Tierhäuten schmarotzende D. vulpinus), sowie die sowohl in Kadavern, als auch in tierischen Exkrementen lebenden Histerarten als Verbreiter des Milzbrandes in Betracht kommen (**Heim** 63, eigene Beobachtung). Nach meinem Dafürhalten sind diese Käfer, von denen viele Arten

bezw. deren Larven in dem auf der Weide abgesetzten, in den oberen Schichten bald eintrocknenden Kuhdung leben und fortgesetzt von einer Stelle zur anderen fliegen und somit fast die gesamten Faeces auf einer Weide infizieren können, die Hauptverbreiter des Milzbrandes unter den Weidetieren.

Die vorstehenden Ausführungen dürften auf verschiedene neue, bezw. wenig bekannte Verbreitungswege des Milzbrandes hinweisen, welche bei der Durchführung sanitärer Maßnahmen zu beachten sind.

Ferner ergeben sich aus den oben geschilderten und durch meine Untersuchungen bestätigten oder ergänzten biologischen Tatsachen für die **Prophylaxe des Milzbrandes** einige wichtige Nutzanwendungen:

Von den als Milzbrandweiden bekannten Örtlichkeiten sollte man grundsätzlich kein Grünfutter, sondern nur Heu gewinnen, das möglichst in der Mittagssonne durch häufiges Wenden gut getrocknet ist. Durch die Sonnenstrahlen wird der größte Teil der in dem Heu etwa enthaltenen Milzbrandsporen abgetötet (3, 177) und ganz vereinzelte Sporen werden in den meisten Fällen vom Darm aus nicht infizieren (Vergl. S. 32).

Poröse Futtermittel, z. B. zerstampfte gekochte mehlige Kartoffeln, Baumwollsaatkuchen, Fleischmehle usw., auf denen eine besonders üppige Sporulation der Milzbrandbazillen stattfinden kann, sollte man nie in einem feuchtwarmen Raume aufbewahren.

Aus dem gleichen Grunde empfiehlt es sich, zum Bau von Anlagen, die der Aufbewahrung, Verarbeitung und Beseitigung von Teilen dienen, welche Milzbrandkeime enthalten, keine porösen Materialien zu verwenden.

Auch das Kalken der Wände und Fußböden ist wegen der sporulationsbefördernden Eigenschaft des kohlensauren Kalks, der ja sehr bald aus der Kalkmilch entsteht, im Sommer besser durch ein anderes Desinfektionsverfahren zu ersetzen.

Torfmull dahingegen dürfte als Streumaterial allen anderen überlegen sein, da der Torf — insbesondere der viel Humussäuren enthaltende schwarze Torf, weniger der helle Sphagnumtorf — das Wachstum der Milzbranderreger hemmt und deren Sporulation verhindert.

Das Gesamtergebnis meiner Untersuchungen fasse ich in folgende Schlußsätze zusammen:

1. Die angestellten Versuche zeigen, daß weniger die Stoffwechselprodukte der Bazillen es sind, welche sie zur Sporulation veranlassen, als vielmehr der plötzliche Übergang in ungünstigere Ernährungsverhältnisse (Wasser, eiweißfreie Nährböden, poröse Substrate usw.).

2. Die schnellste und reichlichste Sporenbildung des B. anthracis erzielte ich auf Platten von Holzkohle (Lindenholzkohle), die mit Löfflerscher Bouillon oder mit eiweißfreier Nährlösung getränkt war.

3. Holzkohlenstäbe dürften daher den Gipsstäben für den Versand von Milzbrandmaterial zur Untersuchungsstelle vorzuziehen sein.

4. Die Sporenrasen lassen sich nach einiger Zeit auf der Holzkohle, wenn sie nicht zu feucht ist, schon mit bloßem Auge als graue Flecke erkennen, ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Methoden, die bei der Nachprüfung und zur Sicherung der Milzbranddiagnose im Gebrauch sind.

5. Nicht jedes poröse Substrat ist zum Versand von Milzbrandmaterial geeignet. Thonhaltige Stoffe scheinen die Sporulation zu verzögern und Strohpappe kann sogar, jedenfalls infolge Einwirkung darin enthaltener Gifte, die Bazillen abtöten.

6. Für das Zustandekommen einer reichlichen Sporenbildung des B. anthracis sind unbedingt eine Temperatur von 18—32 Grad C., eine möglichst ausgiebige Sauerstoffumspülung der Milzbrandfäden und eine Feuchtigkeit des Substrats von etwa 50—150% des Gewichts der Trockensubstanz erforderlich.

7. Die Verbreitung des Milzbrandes dürfte in erster Linie durch poröses Material, das Sporen in großer Menge enthält, z. B. Tierhäute, Staub, Erdboden, ausländische Futtermittel (Fleischmehl, Kleie) usw., auf der Weide auch durch die in eintrocknendem Kuhdung lebenden Käfer und durch andere Insekten stattfinden.

8. Bei der Durchführung sanitärer Maßnahmen ist daher das Hauptaugenmerk auf diese Stoffe zu richten. Zum Bau von Anlagen, die der Verarbeitung und Beseitigung von Teilen dienen, welche Milzbrandkeime enthalten, sollte man keine porösen Materialien verwenden.

9. Auch das Kalken der Wände etc. ist wegen der sporulationsbefördernden Eigenschaft des kohlensauren Kalks im Sommer besser durch ein anderes Desinfektionsverfahren zu ersetzen.

10. Da der Torf das Wachstum der Milzbranderreger hemmt und deren Sporulation verhindert, so dürfte Torfmull als Streumaterial allen anderen überlegen sein.

Vorstehende Arbeit wurde im Hygienischen Institut der Tierärztlichen Hochschule zu Hannover begonnen und im bakteriologischen Laboratorium der Stadt Hannover, dessen Leiter Verfasser z. Zt. ist, vollendet.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Geheimen Medizinalrat Prof. Dr. Reichenbach-Göttingen für das meiner Arbeit entgegengebrachte große Interesse und für die wertvollen Anregungen meinen wärmsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

1. **Abel,** Die Aetiologie der Ozaena. Zeitschr. f. Hygiene XXI., S. 89.
2. **Adametz,** Über einen Erreger der schleimigen Milch, Bacillus lactis viscosus (Milch-Zeitung 1889, S. 941) Ref. im Zentralbl. f. Bakteriologie VII., S. 768.
3. **Arloing,** Les spores du Bacillus anthracis sont réellement tués par la lumière solaire. Ann. belg. p. 257. Compt. rendus. No. X.
4. **Baas,** Über Bacillus pseudanthracis. Diss. Straßburg 1903.
5. **Baerthlein,** Weitere Untersuchungen über Mutationserscheinungen bei Bakterien. Dtsch. med. Wochenschr. 1912, S. 1443.
6. **Bail,** Veränderungen von Bakterien im Tierkörper, XI. Untersuchung von kapsellosem Milzbrand. Zentralbl. f. Bakt. Orig. 76, 1915, S. 38.
7. — Die Kapselbildung des Milzbrandbazillus. Prag. med. Wochenschr. 1915, S. 29.
8. **Bainbridge,** Some observations on the bacillus anthracoides. Journ. of pathol. and bacteriol. 8, 1902, p. 117.
9. **Baudet,** Asporogene Milzbrandbazillen. Zentralbl. f. Bakteriol. Abt. I, Orig. 60, 1911, S. 462.
10. **Baumann,** Über den Befund von milzbrandähnlichen Bazillen im Wasser. Hyg. Rundschau 1905, S. 7.
11. **v. Behring,** Beiträge zur Aetiologie des Milzbrandes. Zeitschr. f. Hyg. Bd. VI u. VII, 1889, D. med. Wochenschr. 1889.
12. **Bollinger,** Zur Pathologie des Milzbrandes. Arbeiten a. d. pathol. Inst. zu München. 1872, S. 154. Milzbrand. Repert. 3. Heft. S. 174.
13. **Bongert,** Beiträge zur Biologie des Milzbrandbazillus und sein Nachweis im Kadaver der großen Haustiere. Zentralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 34, S. 779 u. Bd. 35.
14. — Bakteriologische Diagnostik. 6. Auflage, 1922, S. 204.
15. **Bordoni-Uffreduzzi,** Über den Proteus hominis capsulatus und über eine neue durch ihn erzeugte Infektionskrankheit des Menschen. Zeitschr. f. Hygiene. Band III, S. 333.
16. **Buchner,** Ursache der Sporenbildung. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 7, 1890, S. 3.

17. — Über die physiologischen Bedingungen der Sporenbildung beim Milzbrandbazillus. Zentralbl. f. Bakt. XX., 1897, S. 806.
18. **Burri,** Milzbrandähnlicher Bazillus aus südamerikanischem Futtermehl. Hygien. Rundschau. 1894, 8. S. 339.
19. **Caro,** Della maniera in cui i bacilli del carbonchio si comportano nel latte nel prime 24 ore. La Rif. med. 1893 p. 84. Ref. Zentralbl. f. Bakt. 1893, S. 398.
20. **Chauveau,** Des limites, des conditions et des conséquences de la variabilité du bacillus anthracis. Archives de médecine expérimentale et d'anatomie pathol. 1889, No. 6.
21. **Ciani,** Sulla capsula del «Bacillus anthracis». Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, Ref. 61, 1914, S. 399.
22. **Collin,** Über ein neues, im Fischmehl gefundenes pathogenes Kapselbakterium. Diss. Hannover 1919.
23. **Dalrymple,** Anthrax and tick fever. Am. vet. rev. 46, p. 298. Am. vet. rev. 40, 1912, p. 601.
24. **Danèk,** Zur Frage des Nachweises von Milzbrandbazillen aus Bakteriengemischen durch Ausschüttelung mit Kohlenwasserstoffen (Petroläther und Pentan). Wien. tierärztl. Monatsschr. 1915, S. 1.
25. **Darling** and **Bates,** Anthrax of animals in Panama with a note on its mode of transmission by Buzzards. Proc. of the Canal Zone med. assoc. 5, Part. 1, p. 103.
26. **Eberle,** Untersuchungen über die Sporulation der Milzbrandkeime und ihre Bedeutung für die Nachprüfung der Milzbranddiagnose. Zeitschr. f. Infektionskr. etc. d. Haustiere II. p. 224.
27. **Eickmann,** Welche ist die beste Versendungsmethode von Milzbrandmaterial zur Nachprüfungsstelle? Diss. Bern 1908.
28. **Einecker,** Bakteriologische Bemerkungen zu «Darmmilzbrand bei Menschen«. Med. Klinik. 1918, S. 1162.
29. **Eisenberg,** Untersuchungen über die Variabilität der Bakterien. III. Weitere Untersuchungen über das Sporenbildungsvermögen bei Milzbrandbazillen. Zentralbl. f. Bakt. 73, 1914, S. 81.
30. **Engler,** Experimentelle Untersuchungen hinsichtlich der für die Bewirkung der Sporulation des Milzbrandbazillus geeignetsten Substrate. Diss. Bern 1911.
31. **Enoch,** Zum Nachweis der Milzbranderreger im Fischmehl. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1914, S. 361.

32. **v. Esmarch,** Das Schicksal der pathogenen Mikroorganismen im toten Körper. Zeitschr. f. Hygiene. Bd. VII, S. 14—21.
33. — Milzbrandsporenbildung auf Fellen und ihre Desinfektion. Festschr. z. 60. Geburtstage von R. Koch. Jena 1903, 239—252.
34. **Eurich,** The cultivation of anthrax bacilli from wool and hair. Journ. of pathol. and bacteriol. 17, 1912, p. 249.
35. **Mc. Farland,** Bacillus anthracis similis. Zentralbl. f. Bakteriologie, Abt. I Orig. 24, 1898, S. 556.
36. **Ficker,** Robert Koch, Die Aetiologie der Milzbrandkrankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus anthracis. Klassiker d. Med. v. Sudhoff, 9, 1910.
37. **Fiorentini,** Un caso di carbonchio nel cavallo con infezione par le via linfatica intestinale. (Bolletino della società medico-chirurgica di Pavia1895) Ref. i. Zentralbl. f. Bakt. lXX, S. 351.
38. **Fischoeder,** Beiträge zur Kenntnis des Milzbrandes. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, Orig. 51, 1909, S. 320.
39. — Die Milzbranddiagnose. Fortschr. d. Vet.-Hygiene I, S. 3, 64, 106.
40. **Fitch,** Organisms morphologically resembling anthrax bacteria. Rep. of the New York State vet. College for the year 1909/10, p. 200.
41. **Flügge,** Grundriß der Hygiene. 4. Aufl. 1897, S. 55.
42. — Mikroorganismen. 3. Aufl. 1896. Bd. II. p. 233.
43. **Foth,** Zur bakteriologischen Diagnose des Milzbrandes. D. tierärztl. Wochenschr. 1919, S. 398.
44. — Die Kapsel des Milzbrandbazillus. Zeitschr. f. Infektionskr. etc. der Haustiere. 21, 1920, S. 57.
45. **Frank,** Über den Untergang der Milzbrandbazillen im Tierkörper. Zentralbl. f. Bakt. IV, S. 23.
46. **Fränkel,** Die Einwirkung der Kohlensäure auf die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen. Zeitschr. f. Hygiene V, S. 353.
47. — (Hygien. Rundschau. 1901. No. 13.)
48. **Frankland** and **Ward,** First report to the water research comminee of the Royal Society, on the present state of our knowledge concerning the bacteriology of water, with especial reference to the vitality of pathogenic Schizomycetes in water. (Proceedings of the Royal Society. V. LI, p. 183—279). Ref. im Zentralbl. f. Bakt. 1893, S. 68.
49. **Galtier,** Rôle de l' examen bactériologique dans le diagnostic du charbon baktéridien. Journal de méd. vét. 1904, p. 16.

50. **Gärtner,** Über den Einfluß des Nährmaterials auf die Entwicklung und Sporenbildung des Milzbrandbazillus. (Festschr. z. 60. Geburtstag von R. Koch. Jena 1903.)
51. **Gegenbauer,** Saprophytisches Wachstum von Milzbrandkeimen auf tierischen Haaren. Arch. f. Hyg. 89, 1920, S. 202.
52. **Van Geuns,** Über das «Pasteurisieren» von Bakterien. Ein Beitr. z. Biologie d. Mikroorganismen. Archiv f. Hyg. Bd. 9, 1889.
53. **Glynn and Lewis,** The detection of anthrax spores in industrial material. Journ. of Hyg. 12, 1912. p. 227.
54. **v. Gonzenbach,** Auffallend reichlicher Befund von Milzbrandsporen in der Erde eines Abdeckplatzes. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. 79, 1915, S. 336.
55. **Gottheil,** Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. Zentralbl. f. Bakt. II. Bd. 7. p. 430.
56. **Gottstein,** Ein Beitrag zur Milzbranddiagnose. Hyg. Rundschau 1902, S. 1185.
57. **Grabert,** Ein weiterer Beitrag zum bakteriologischen Milzbrandnachweis. Ztschr. f. Infektionskr. etc. der Haustiere. 1910. S. 239—255.
58. **Gruber** und **Futaki,** Über die Resistenz gegen Milzbrand und über die Herkunft der milzbrandfeindlichen Stoffe. Münch. med. Wochenschr. 1907. S. 249.
59. **Günther,** Einführung in das Studium der Bakteriologie. Leipzig 1902, S. 314.
60. **Hartleb** und **Stutzer,** Das Vorkommen von Bacillus pseudanthracis im Fleischfuttermehl. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, 3, 1897, S. 129 u. 179.
61. **Heim, L.,** Lehrbuch der Bakteriologie. 4. Aufl., 1911, S. 297.
62. — Das Muzin der Milzbrandbazillen. Münch. med. Wochenschr. 1904., No. 10, S. 426.
63. **Heim,** Du rôle de quelques coléoptères dans la dissémination de certains cas de charbon. Compt. rend. Soc. Biol. 3.
64. **Henri,** Etude de l'action métabiotique des rayons ultraviolets. Productions de formes de mutation de la bactéridie charbonneuse. Cpt. rend. séances de l'acad. de scienc. 158, 1914, p. 1032.
65. **Hess, H.,** Die Bedeutung der Kapsel für die Virulenz des Milzbrandbazillus. Arch. f. Hyg. 89, 1920, S. 237.
66. **Hesse,** Über die gasförmigen Stoffwechselprodukte beim Wachstum der Bakterien. Zeitschr. f. Hyg. XV., 1893, Heft 1.

67. **Hewlett and Hall,** The influence of the culture medium of the germination of anthrax spores, with special reference to desinfection experiments. J. Hyg. Cambridge, 1911., p. 473.
68. **Hoppe,** Verbreitung milzbrandähnlicher Bazillen in der Außenwelt. Dissert. Leipzig 1908.
69. **Hruska,** Untersuchungen über die Bakterizidie des Harnes gesunder Tiere. Wien. tierärztl. Wochenschr. 1917, S. 415.
70. **Hüppe u. Wood,** Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Saprophytismus und Parasitismus. I. Über Schutzimpfungen gegen Milzbrand. Berl. klin. Wochenschr. 1889, S. 347.
71. **Jacobitz,** Die Sporenbildung des Milzbrandes bei Anaërobiose (bei Züchtung in reiner Stickstoffatmosphäre). Zentralbl. f. Bakt. XXX., p. 232.
72. **Jacobsthal u. Pfersdorff,** Grundlagen einer biologischen Methode zum Nachweis des Milzbrandes in der Praxis. Zeitschr. f. Infektionskr. etc. d. Haustiere I.
73. **Jaenisch,** Beitrag zum Nachweis von Milzbrand. Münch. med. Wochenschr. 1914, S. 305.
74. **Jansen,** Über die Widerstandsfähigkeit der Bakteriensporen gegenüber dem Licht. Mitteil. aus Finsens med. Lichtinst. Bd. 5, S. 120.
75. **Jarmai,** Über die hämolystische Wirkung des Milzbrandbazillus und der milzbrandähnlichen Saprophyten. Zentralbl. f. Bakt., Abt. I. Orig. 70, 1913, S. 72.
76. **Kaesewurm,** Über einen Pseudomilzbrandbazillus. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. XIV., 1904, S. 138.
77. **Karlinski,** Zur Kenntnis der Verbreitungswege des Milzbrandes. Zentralbl. f. Bakt. V., Nr. 1.
78. **Kehoe,** Anthrax in South Africa, Union of South Africa, Dep. of Agr. 5. and 6. Rep. of vet. Res. Pretoria 1919, p. 211.
79. **Kercelli,** Contribution à l'étude de la propagation du charbon par le chien. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 77, 1914, p. 263.
80. **Kern,** Über die Kapsel des Anthraxbacillus. Zentralbl. f. Bakt. I. Bd. 22, S. 166.
81. **Kersten,** Über einen neuen säure- und alkoholfesten Erdbazillus, nebst kurzen Bemerkungen über die zu seiner Isolierung angewandte Methode (Antiforminmethode n. Uhlenhuth u. Kersten). Zentralbl. f. Bakt. I. Bd. 51, 1909, S. 494.

82. **Kitt,** Bakterienkunde und pathol. Mikroskopie. Wien 1903.
83. **Kitasato,** Untersuchungen über die Sporenbildung der Milzbrandbazillen in verschiedenen Bodentiefen. Zeitschr. f. Hyg. VIII., S. 199.
84. **Koch, R.,** Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Herausgeg. von Dr. Ferd. Cohn. 1876, S. 277—310.
85. — **u. Wolffhügel,** Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. I., 1881.
86. **Koch,** Milzbrand durch Insektenstich. Zentralbl. f. Bakt. I., Ref. 57, 1913, Beiheft, S. 279.
87. **Kodama,** Über Kapselbildung der Milzbrandbazillen auf Schrägagar. Zentralbl. f. Bakt. Orig. 62, 1912, S. 177.
88. **Koelsch,** Der Milzbrand und seine sozialhygienische Bedeutung für Landwirtschaft und Industrie. München 1918.
89. **Köhler, Fr.,** Die kulturellen Eigenschaften der verschiedenen Pseudomilzbrandbazillen unter besonderer Berücksichtigung ihres Vorkommens im Fischmehl. Dissert. Hannover 1919.
90. **Krompecher,** Untersuchungen über das Vorkommen metachromatischer Körnchen bei sporentragenden Bakterien und Beiträge zur Kenntnis der Babès-Ernst'schen Körperchen. Zentralbl. f. Bakt. Bd. 30, S. 385, 425.
91. **Kruse, W.,** Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910.
92. **Kuylenstierna, G.,** Sporenbildningen hos mjeltbrandbacillen vid Anaërobios. Beiblatt zu Svensk Farmac. Tidskr. 55. Ref. in A. Koch, Jahresbericht, 13, 1902.
93. **Lammert,** Nachweis von Milzbrand in Futtermitteln mit Hilfe der Präzipitationsmethode. Dissert. Hannover 1913.
94. **Lange,** Diskussionsbemerkung. Zentralbl. f. Bakt. I. Ref. 57, 1913, Beiheft, S. 279.
95. **Lauenstein,** Untersuchungen über die hämolytische Wirkung von Bakterien. Dissert. Hannover 1913.
96. **Lehmann u. Neumann,** Atlas und Grundriß der Bakteriologie. München 1903.
97. **Levy,** Seventh Report of Michigan Academy of Sciences. 1905, p. 173.
98. **Lignières et Durien,** Formes anormales de la bactéridie charbonneuse isolées dans le sang d'un taureau mort de maladie naturelle. Bullet. de la soc. centrale de méd. vét. 1902, 28, II.

99. **Maaßen,** Teratologische Wuchsformen (Involutionsformen) der Bakterien und ihre Bedeutung als diagnostisches Hilfsmittel. Arbeiten aus d. Kaiserl. Ges.-Amte. 21. Bd. 1904.
100. **Malzew,** Der Einfluß des Lichtes auf Anthraxkulturen. Comptes rendus d. Charkower Vet. Inst.
101. **Marasini,** Über das Vorhandensein einer den Körper einiger Bakterien umgebenden Hülle und deren Bedeutung. Zentralbl. f. Bakt. I. Orig. 71, 1913, S. 113.
102. **Markoff,** Studien über Variabilität der Bakterien, zugleich ein Beitrag zur Morphologie und Biologie des Milzbrandbazillus. Zeitschr. f. Infektionskr. d. Haustiere. 12, 1912, S. 137.
103. **Martin,** The chemical products of the growth of Bacillus anthracis and their physiological actions. Proceedings of the Royal Society of London. 1890, 22.
104. **Marxer,** Erfahrungen aus der Praxis mit einer neuen Methode zum Nachweis der Milzbrandbazillen. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 15, Heft 5.
105. **Matsui,** Versuche über die Widerstandsfähigkeit kapselhaltiger und kapselloser Milzbrandbazillen. Zentralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. 75, 1915, S. 394.
106. **Matzuschita,** Bakteriologische Diagnostik. Jena 1902.
107. **Mazzini,** Contributo sperimentale della diagnosi del carbonchio ematico. Arch. scient. d. r. Soc. ed Accad. vet. ital. Torino, 1907, p. 97.
108. **Meyer, J.,** Über die Einwirkung flüssiger Luft auf Bakterien. Zentralbl. f. Bakt. I. Bd. 28, 1900, S. 594.
109. **Meyer,** Zum Nachweis der Milzbranderreger im Fischmehl. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I., Orig. 85, 1903, S. 177.
110. **Migula,** System der Bakterien. Jena, 1900.
111. **Mitzmain,** Experimental insect transmission of anthrax. Publ. Health Reports 1914, p. 75.
112. **Mollet,** Beiträge zur Aetiologie des Milzbrandes. Die Bedeutung von Krähe und Fuchs für die Verbreitung dieser Krankheit. Zentralbl. f. Bakt., I. Orig. 70, 1913, S. 19.
113. **Momont,** Action de la dessiccation, de l'air et de la lumière sur la bactéridie charbonneuse filamenteuse. Ann. de l'Inst. Pasteur. 1892, I. p. 21.
114. **Montella,** L'azione sterilizzante del vapor d'acqua a 100 sulla spore del B. carbonchio. Boll. Soc. Laucisiana di Roma; t. 22, fasc. 2.

115. **Müller, M.,** Über das Vorkommen von asporogenem Milzbrand unter natürlichen Verhältnissen. Zentralbl. f. Bakt., Abt. I., Orig. 66, 1912, S. 501.

116. **Müller, M. u. Engler, A.,** Über die Erhöhung der Leistungsfähigkeit des Straßburger Verfahrens zum Nachweis von Milzbrand. Zeitschr. f. Infektionskr. etc. d. Haustiere. 1910. S. 347.

117. **Neufeld,** Diskussionsbemerkung. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I., Ref. 57, 1913, Beiheft, S. 279.

118. **Nocard,** L'étiologie du charbon. Recueil de méd. vét. 1881, p. 1189.

119. **Noetzel,** Über den Nachweis von Kapseln an Mikroorganismen. Fortschr. d. Med., Bd. 14, Nr. 2. Ref. i. Zentralbl. f. Bakt., Bd. 19, S. 498.

120. **Oppermann,** Experimentelle Beiträge zur Aetiologie der natürlichen Milzbrandfälle. Dissert. Gießen 1905.

121. **Orlando e Valentini,** Aislamiento del Bacillus anthracis. Modification del metodo de Straßburg. Revista Zootecnica 5, 1914, p. 457.

122. **Osborne,** Die Sporenbildung des Milzbrandbazillus auf Nährböden von verschiedenem Gehalt an Nährstoffen. Archiv f. Hyg., Bd. XI.

123. **Ottolenghi,** Ricerche sperimentali su tre bacilli simili al bacillus anthracis. Atti d. R. accad. Fisio-Critici. Serie 4, vol. 15. Ref. in Baumgartens Jahresber. 1903, S. 173.

124. **Pane,** Sull'azione del bacillo del carbonchio nel cane, forma nodosa capsulata, che assume il bacillo carbonchioso nel siero di sangue del cane. La Riforma med. 1891, Nr. 211, p. 723.

125. **Pfeiler,** Zur Milzbranddiagnose durch Untersuchung des Knochenmarks. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1919, S. 421.

126. **Pfeiler u. Drescher,** Untersuchungen über die Beziehungen der Pseudomilzbrandbazillen zu den Milzbranderregern mittels der Präzipitationsmethode. Zeitschr. f. Infektionskr. d. Haustiere 13, 1913, S. 391.

127. — **u. Schreyer,** Ein Beitrag zur Bewertung der Methoden für die bakteriologische und serologische Milzbranddiagnose mit besonderer Berücksichtigung des mikroskopischen Nachweises. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1916, S. 25.

128. **Pfersdorff,** Stoffwechselprodukte des Milzbrandbazillus. Zeitschr. f. Tiermed. VIII., 79, 1904.
129. **Pianese,** Giornale dell'assoziacione napoletane dei medici e naturalisti. Vol. V., 1892, p. 95.
130. **Pokschischewsky,** Zur Frage über die biologische Einheit des Bacillus anthracis und pseudanthracis. Zentralbl. f. Bakt., Abt. I., Ref. 59, 1914, S. 194.
131. — Über die Biologie der Pseudomilzbrandbazillen. Beiträge zur Differentialdiagnose der Milzbrand- und Pseudomilzbrandbazillen. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, 47, 1914, S. 541.
132. **Pollak,** Die Diagnose der Milzbrandsepsis aus dem Lumpalpunktat. Wien. Klin. Wochenschr. 1912, S. 1702.
133. **Poppe, K.,** Neue Ergebnisse der Milzbrandforschung und Milzbrandbekämpfung. Ergebnisse der Hygiene, Bakteriologie, Immunitätsforschung und experimentelle Therapie. Bd. 5, 1922, S. 597.
134. **Praetorius,** Milzbranddiagnose durch Untersuchung des Liquor cerebrospinalis. Zentralbl. f. Bakt., I. Ref. 61, 1914, S. 388.
135. **Preisz,** Studien über Morphologie und Biologie des Milzbrandbazillus. Zentralbl. f. Bakt. Bd. 35, p. 280, 416, 537, 657. Über Varietäten des abgeschwächten Milzbrandvirus. Ebenda I. Bd. 47, S. 585.
136. **Ravenel, M. P.,** The resistance of bacteria to cold. New York Medical News. Vol. LX., LIV., June 10. 1899.
137. **Reinecke,** Der heutige Stand der Milzbranddiagnose. Zeitschr. f. Vet.-Hyg., Berl. 1905, 193—212.
138. **Reiter,** Über die Gewinnung resistenter Milzbrandsporen. Arch. f. Hyg. 89, 1920, S. 191.
139. **Reye,** Innerer Milzbrand. Münch. med. Wochenschr. 1914, S. 844.
140. **Rohland,** Abwässer und Milzbrand. Halbmonatsschr. f. soz. Hyg. u. prakt. Med. 1916, 8. 16.
141. **Rosshaur,** Über Bacillus pseudoanthracis. Dissert. Straßburg 1902/1903.
142. **Roth,** Das Schicksal der Milzbrandkeime in der Stalljauche. Zentralbl. f. Bakt., Abt. I., Orig. 63, 1912, S. 372.
143. **Rothschild,** Darmmilzbrand beim Menschen. Med. Klinik 1918, S. 1160.

144. **Rotky,** Veränderungen von Bakterien im Tierkörper. VIII. Versuche über die Kapselbildung des Milzbrandbazillus. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 74, 1914, S. 285.

145. **Ruzicka,** Sporenbildung und andere biologische Vorgänge bei dem Bacterium anthracis. Arch. f. Hyg., 1908, Bd. 64, S. 291.

146. **Scagliosi,** Über veränderte Eigenschaften des Bacillus anthracis. Zentralbl. f. Bakt. Bd. 37, S. 649.

147. **Schäfer,** Die bakteriologische Untersuchung des Darminhalts als Mittel zur Feststellung des Milzbrandes. Dissert. Stuttgart 1912.

148. **Schiele,** Untersuchungen über die postmortale bakteriologische Milzbranddiagnose durch Anlegen von Kulturen aus der Haut. Dissert. Stuttgart 1911.

149. **Schmitz,** Beitrag zur Frage des lokalen Milzbrandes beim Schweine. Zentralbl. f. Fleisch- u. Milchhygiene, Jahrg. 23. 1913, S. 289.

150. **Schnürer,** Über den Milzbrand bei Schweinen und die Borstendesinfektion. Wien. Arbeit a. d. Geb. d. soz. Med. 1910. S. 59.

151. **Schramm**, Entstehung des Milzbrandes durch Grasen von Rindern auf einer durch Trockenlegung eines Teiches hergestellten Weidefläche. Berl. Archiv, S. 127.

152. **Schreiber**, Über die physiologischen Bedingungen der endogenen Sporenbildung bei Bacillus anthracis, subtilis und tumuscens. Zentralbl. f. Bakt. I. Band 20, 1896, S. 353, 429.

153. **Schuberg u. Kuhn**, Übertragung von Krankheiten durch einheimische stechende Insekten. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh.-Amte 40. 1912, S. 209.

154. — **u. Bönig**, dto. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh.-Amte 47, 1914. S. 491.

155. **Schulz**, Beschreibung eines Bazillus, welcher dem Milzbranderreger sehr ähnlich ist. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, 30. S. 582.

156. **Schürmann**, Ein Fall von Meningitis, herbeigeführt durch einen milzbrandähnlichen Bazillus. Zeitschr. f. Medizinalbeamte 1916, S. 385.

157. **Sclavo**, Neue experimentelle Untersuchungen über die Heilwirkung des Milzbrandserums. Berl. klin. Wochenschr. 1901, No. 18 und 19.

158. **Selter**, Über Sporenbildung bei Milzbrand und anderen sporenbildenden Bakterien. Zentralbl. f. Bakt. Bd. 37, S. 186.
159. **Serafini**, Sulla esistenza della capsula del bacillo del carbonchio. Progr. Medico. Napoli 1888. Ref. im Zentralbl. f. Bakt. XXII, S. 166.
160. **Senge**, Meningitis purulenta et Encephalitis haemorrhagica nach Lumbalanästhesie, verursacht durch einen eigenartigen Sporenbildner. Zentralbl. f. Bakt., Abt. I. Orig. 70, 1913, S. 223 u. 439.
161. **Słupski**, Bildet der Milzbrandbazillus unter streng anaëroben Verhältnissen Sporen? Zentralbl. f. Bakt. Bd. 30, 1901, S. 396.
162. **Sirk**, Beitrag zur Differentialdiagnose von Milzbrand- und Pseudomilzbrandbazillen mittels Hämolyse. Wien. tierärztl. Monatsschr. Jahrg. 3, 1916, S. 33.
163. **Soyka**, Bodenfeuchtigkeit und Milzbrandbazillen. Fortschr. d. Med., Bd. 4, 1886 (Med. Zentralbl. No. 35).
164. **Steinschneider**, Beitrag zur Frage der Kapselbildung des Milzbrandbazillus. Hyg. Rundschau 1913, S. 377.
165. **Stemmer**, Die bakteriologische Untersuchung der Lunge als Mittel zur Feststellung des Milzbrandes. Diss. Stuttgart 1912.
166. **Stiennon**, Ausbleiben der Phagocyten nach Injektion von Milzbrandbazillen mit Kapsel. Ann. de méd. vét. T. 56, p. 391.
167. **Strong**, A study of the encapsulated bacilli. Journ. of the Boston Soc. of the Med. Sciences. Vol. III., 1899, p. 185.
168. **Süpfle**, Über die Bedeutung der Kapsel für die Virulenz des Milzbrandbazillus. Monatsh. f. prakt. Tierheilk. 32, 1921, S. 72.
169. **Sutherland**, The detection of anthrax spores in East India wool and in yarn manufactured therefore. Journ. of hyg. 13, 1914, p. 403.
170. **Szász**, Über die bakteriologische Diagnostik des Milzbrandes unter Zuhilfenahme der Lunge. Zeitschr. f. Infektionskr. d. Haustiere 11, 1912, S. 43.
171. — Über die durch Trinkwasser erzeugten Milzbrandepidemien. Ebenda 15, 1914, S. 442.
172. **Turrò**, Zur Bakterienverdauung. Zentralbl. f. Bakt. I. Bd. 28, S. 173 u. Bd. 32, S. 105.
173. **Uémara**, Untersuchungen über milzbrandähnliche Bazillen. Zentralbl. f. Bakt. I. Orig. 75, 1914, S. 21.
174. **Valenti**, Beitrag zur Kenntnis der Pseudomilzbrandbazillen. Ref. im Jahresbericht v. Ellenberger-Schütz. 1911, S. 22.

175. **Wagner,** Beiträge zur Kenntnis der Milzbrand- und milzbrandähnlichen Bazillen. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 84, 1920, S. 386.

176. **Wahrlich,** Bakteriologische Studien II. Bazillus pseudanthracis. S.—A. aus Scripta Botanica. p. 30. St. Petersburg 1890/91. Zentralbl. f. Bakt. 11, 1892, S. 49.

177. **Ward,** Experiments on the action of light on Bacillus anthracis. Communication made to the Royal Society. 1892. Ref. im Zentralbl. f. Bakt. 1893, S. 568.

178. **Wauschkuhn,** Der Vorgang der Sporenbildung beim Milzbrandbazillus. Ebenda, Orig. 84, 1920, S. 31.

179. **Weichardt,** Über Stoffwechselvorgänge von Parasiten und Saprophyten sowie über deren praktisch verwertbare Unterschiede behufs Differenzierung. Arch. f. Hyg. 73, 1911, S. 153.

180. **Weil,** Zur Biologie des Milzbrandbazillus. Arch. f. Hyg. 1899.

181. — Die Sporenbildung des Milzbrandes bei Anaërobiose. Zeitschr. f. Hyg. XXXVI., S. 451.

182. **White,** Medical Record. New York 1899.

183. **Wilamowsky,** Ein Fall von Pseudoanthrax. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. 53, 1912, S. 483 u. ebenda Orig. 66, 1912, S. 39.

184. **Willach,** Milzbrand oder nicht Milzbrand? Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1896, No. 19.

185. **Woloschin,** Zur Morphologie und Biologie des Milzbrandbazillus im tierischen Organismus. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 72, 1913, S. 312.

186. **Wood,** Tonsillar infection, (concerning the passage of anthrax bacilli through the tonsillar tissues). Americ. Journ. of the med. sciences 147, 1914, p. 380.

187. **Wüstenberg,** Besitzt der lebende Milzbrandbazillus eine Kapsel? Unter welchen Einflüssen entsteht die Kapsel? Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilkunde 1917, S. 49.

188. **Wulff,** Die Milzbranddiagnose durch Untersuchung des Knochenmarks. Zeitschr. f. Infektionskr. d. Haustiere 12, 1912, S. 266.

189. **Zingle,** Über einen Befund von Pseudomilzbrandbazillen in Fischmehl mit positiver Ascolireaktion. Zeitschr. f. Infektionskr. etc. d. Haustiere, 15, 1914, S. 131.

190. **Zipp,** Untersuchungen über die Sporulation der Milzbrandbazillen bei Kaninchen vor und nach dem Tode. Diss. Bern 1914.

BERICHTIGUNGEN.

Seite 1, Zeile 20 statt »Milzbrandforschungen« zu setzen »Milzbrandforschung«.

Seite 10, Zeile 26 statt »malignem« zu setzen »malignen«.

Seite 25, Zeile 12 statt »entwickeln« zu setzen »entwickelten«.

Seite 25, Zeile 13 statt »Feuchtigkeitsoptimus« zu setzen »Feuchtigkeitsoptimums«.